

Univerzitní studijní programy

Nanotechnologie

Bakalářská práce

**Elektrostatické zvlákňování a charakterizace  
nanovlákných vrstev na bázi derivátů kyseliny  
hyaluronové**

**Electrostatic spinning and characterization of hyaluronic acid  
derivatives-based nanofiber layers**

**Student:**

Kristina Persichová

**Vedoucí bakalářské práce:**

Mgr. Kateřina Mamulová Kutláková, Ph.D.

**Konzultant bakalářské práce:**

Ing. Adéla Kotzianová, Ph.D.

Ostrava, 2021

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala zejména Mgr. Kateřině Mamulové Kutlákové, Ph.D. a Ing. Adéle Kotzianové, Ph.D. za odborné vedení bakalářské práce, cenné rady a konzultace v průběhu zpracování této práce. Chtěla bych také poděkovat Ing. Lence Bardoňové za vstřícnost a všestrannou pomoc. Zároveň bych chtěla velmi poděkovat firmě Contipro a.s. za umožnění stáže a zaměstnancům, kteří se podíleli na vytvoření podmínek potřebných pro realizaci praktické části této práce. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat své rodině a příteli za podporu během studia.

Tato práce vznikla za podpory projektu číslo CZ.02.1.01/0.0/0.0/17\_049/0008441 „Inovativní léčebné metody pohybového aparátu v úrazové chirurgii“ v rámci Operačního programu Výzkum, vývoj a vzdělávání, který je financován Evropskou unií.

## Abstrakt

Cílem bakalářské práce bylo připravit nanovláknenné vrstvy na bázi derivátů kyseliny hyaluronové metodou elektrostatického zvlákňování. K přípravě byly použity deriváty lauroyl hyaluronan a furanyl hyaluronan. V průběhu procesu elektrostatického zvlákňování bylo do vrstev inkorporováno modelové barvivo chlorofenolová červeň. Morfologie nanovláknenných vrstev byla charakterizována pomocí skenovací elektronové mikroskopie. Byla určena gramáž vrstev, botnavost vrstev v roztoku fosfátového pufru a bylo sledováno zachování nanovláknenné struktury. Byla stanovena enkapsulační účinnost modelového barviva. Kinetika uvolňování modelového barviva z polymerní matrice byla studována pomocí vsádkové metody s dialyzační membránou a uvolňováním barviva do gelu. Zvolená nanovláknenná matrice neměla na kinetiku uvolňování zásadní vliv. Vrstvy obsahující kyselinu hyaluronovou a lauroyl hyaluronan si oproti vrstvám obsahujícím furanyl hyaluronan nezachovaly nanovláknennou strukturu v roztoku fosfátového pufru, zachovaly si svou mechanickou pevnost a množství uvolněného barviva bylo nižší.

**Klíčová slova:** elektrostatické zvlákňování, nanovláknenné vrstvy, deriváty kyseliny hyaluronové, botnavost, uvolňování aktivních látek

## Abstract

The aim of this bachelor thesis was to prepare nanofiber layers based on hyaluronic acid derivatives by electrospinning. The derivatives lauroyl hyaluronan and furanyl hyaluronan were used. During the electrospinning, the model dye chlorophenol red was incorporated into the layers. The morphology of the nanofiber layers was characterized by scanning electron microscopy. The yield of the electrospinning process, the swelling of the layers in the phosphate buffer solution and the preservation of the nanofiber structure were determined. The encapsulation efficiency of the model dye was also determined. The release of the model dye from the polymer matrix was studied using a dialysis method. The release of the dye into the gel was also monitored. The selected nanofiber matrix did not have significant influence on the release kinetics. The layers containing hyaluronic acid and lauroyl hyaluronan did not maintain the nanofiber structure in the phosphate buffer solution, kept their mechanical strength and the amount of dye released was lower compared to the layers containing furanyl hyaluronan.

**Key words:** electrospinning, nanofiber layers, hyaluronic acid derivatives, swelling, release of active substances

## Obsah

Seznam použitých zkratk a symbolů .....	7
Seznam obrázků.....	8
Seznam tabulek.....	10
1. Úvod.....	11
2. Elektrostatické zvlákňování .....	13
2.1. Princip a průběh elektrostatického zvlákňování .....	13
2.2. Kolektory .....	15
2.2.1. Rotační kolektory .....	15
2.2.2. Statické kolektory .....	16
2.3. Emitory .....	16
2.3.1. Jehlové emitory .....	17
2.3.2. Bezjehlové emitory.....	17
2.4. Faktory ovlivňující elektrostatické zvlákňování .....	18
2.4.1. Parametry elektrostatického zvlákňování .....	18
2.4.2. Parametry roztoku.....	18
2.4.3. Parametry prostředí.....	20
3. Kyselina hyaluronová a její deriváty.....	21
3.1. Kyselina hyaluronová .....	21
3.1.1. Chemická struktura.....	21
3.1.2. Biologické vlastnosti .....	21
3.1.3. Syntéza .....	22
3.2. Deriváty kyseliny hyaluronové .....	22
3.2.1. Furanyl hyaluronan.....	23
3.2.2. Lauroyl hyaluronan.....	23
3.3. Elektrostatické zvlákňování kyseliny hyaluronové a jejích derivátů.....	24
3.4. Využití kyseliny hyaluronové a jejích derivátů .....	25

4.	Uvolňování aktivních látek .....	27
4.1.	Řízené uvolňování aktivních látek a jeho mechanismy .....	28
4.2.	Inkorporace aktivních látek do nanovláknenných struktur .....	28
4.3.	Faktory ovlivňující uvolňování aktivních látek z nanovláknenných struktur .....	30
4.3.1.	Molekulová hmotnost a koncentrace léčiva .....	30
4.3.2.	Rozpustnost léčiva ve vodě a kompatibilita s polymerem .....	31
4.3.3.	Vlastnosti polymeru .....	31
4.3.4.	Další faktory ovlivňující uvolňování .....	31
4.4.	Matematické modely uvolňování aktivních látek .....	32
4.5.	Metody stanovení kinetiky uvolňování aktivních látek .....	32
5.	Praktická část .....	34
5.1.	Chemikálie .....	34
5.2.	Přístroje .....	34
5.3.	Příprava roztoků .....	34
5.4.	Elektrostatické zvláknění .....	36
5.5.	UV cross-linking .....	37
5.6.	Metody charakterizace .....	37
5.6.1.	Skenovací elektronová mikroskopie .....	37
5.6.2.	Gramáž .....	37
5.6.3.	Enkapsulační účinnost .....	38
5.6.4.	Botnavost .....	38
5.6.5.	Uvolňování barviva vsádkovou metodou .....	39
5.6.6.	Uvolňování barviva do gelu .....	39
6.	Výsledky a diskuze .....	40
6.1.	Elektrostatické zvláknění .....	40
6.2.	Skenovací elektronová mikroskopie .....	41
6.3.	Gramáž .....	44

6.4.	Enkapsulační účinnost .....	45
6.5.	Botnavost .....	47
6.6.	Uvolňování barviva vsádkovou metodou .....	50
6.7.	Uvolňování barviva do gelu.....	54
7.	Závěr.....	58
	Seznam použité literatury .....	60
	Přílohy 1–5	

## Seznam použitých zkratk a symbolů

CR	chlorofenolová červeň
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamid
DV	destilovaná voda
EB	elektrostatické zvlákňování s asistencí vzduchu (electroblowing)
ES	elektrostatické zvlákňování
F-HA	furanyl hyaluronan
HA	kyselina hyaluronová
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IPA	izopropylalkohol
L-HA	lauroyl hyaluronan
PBS	fosfátový pufr
PEGDA	poly(ethylenglykol)diakrylát
PEO	polyethylenoxid
PVA	polyvinylalkohol
PVP	polyvinylpyrrolidon
SEM	skenovací elektronová mikroskopie

## Seznam obrázků

Obr. 1: Schéma elektrostatického zvlákňování a přehled faktorů ovlivňujících elektrostatické zvlákňování [3].	14
Obr. 2: Rotační kolektory a) rotační válec, b) válec vytvořený z drátů, c) válec s namotaným drátem, d) rotační disk [3].	15
Obr. 3: Statické kolektory a), b), c) různě uspořádané elektrody, d) kolektor s kovovým hrotem, e) mřížkový kolektor, f) magnety jako kolektor [3].	16
Obr. 4: Schématické znázornění některých typů emitorů [8].	17
Obr. 5: Chemická struktura kyseliny hyaluronové [19].	21
Obr. 6: Chemická struktura a) F-HA [22], b) L-HA, kde R je $(CH_2)_{10}CH_3$ [23].	23
Obr. 7: Přehled využití kyseliny hyaluronové a jejich derivátů [19].	26
Obr. 8: Techniky inkorporace aktivních látek do nanovláken [44].	29
Obr. 9: Schéma dialyzační metody.	33
Obr. 10: Použitý a) emitor [56], b) kolektor [57].	36
Obr. 11: SEM snímky při zvětšení $5000\times$ a) V_L-HA, b) V_L-HA/HA, c) V_L-HA/F-HA před zesítením, d) V_L-HA/F-HA po zesítení, e) V_F-HA_2 před zesítením, f) V_F-HA_2 po zesítení.	41
Obr. 12: Průměr vláken nanovlákných vrstev se směrodatnou odchylkou.	42
Obr. 13: Distribuce průměru vláken s proloženou funkcí hustoty pravděpodobnosti lognormálního rozdělení a) V_L-HA, b) V_L-HA/HA, c) V_L-HA/F-HA, d) V_F-HA_2.	43
Obr. 14: Gramáž nanovlákných vrstev se směrodatnou odchylkou.	44
Obr. 15: Enkapsulační účinnost barviva stanovená metodami HPLC a UV-VIS spektrofotometrie.	46
Obr. 16: Botnavost nanovlákných vrstev se směrodatnou odchylkou.	47
Obr. 17: SEM snímky po 72 h v roztoku PBS při zvětšení $5000\times$ a) V_L-HA, b) V_L-HA/HA, c) V_L-HA/F-HA, d) V_F-HA_2.	49
Obr. 18: Závislosti botnavosti na tloušťce nanovlákných vrstev v jednotlivých časových intervalech a) V_L-HA, b) V_L-HA/HA, c) V_L-HA/F-HA, d) V_F-HA_2.	50



Obr. 19: Uvolňování barviva z jednotlivých vrstev v závislosti na čase a) 0 až 72 h, b) 0 až 8 h. ....	52
Obr. 20: Uvolňování barviva do gelu z vrstvy V_L-HA/HA a) 0 h, b) 15 min, c) 30 min, d) 1 h, e) 2 h, f) 3 h, g) 4 h, h) 8 h, i) 24 h, j) 48 h, k) 72 h. ....	55
Obr. 21: Průměr plochy rozšíření barviva v gelu v závislosti na čase.....	56
Obr. 22: Závislost relativní intenzity na poloze od středu plochy s barvivem po 48 h a) V_L-HA, b) V_L-HA/HA, c) V_L-HA/F-HA, d) V_F-HA_2.....	57

## Seznam tabulek

Tab. 1: Složení připravených roztoků. ....	35
Tab. 2: Parametry elektrostatického zvlákňování roztoků. ....	36
Tab. 3: Výsledné hodnoty gramáže včetně směrodatné odchylky. ....	44
Tab. 4: Výsledné hodnoty enkapsulační účinnosti včetně směrodatné odchylky. ....	45
Tab. 5: Průměrné hodnoty botnavosti včetně směrodatné odchylky. ....	47
Tab. 6: Naměřené hodnoty pro stanovení průměrné uvolněné frakce vrstvy V_F-HA. ....	51
Tab. 7: Maximální uvolněná frakce barviva po 72 h včetně směrodatné odchylky. ....	53
Tab. 8: Průměr plochy rozšíření barviva v gelu v závislosti na čase. ....	56

## 1. Úvod

Elektrostatické zvlákňování je technika sloužící k přípravě nanovláken z polymerního roztoku za pomoci elektrického pole. Jedná se o relativně univerzální techniku, která nachází uplatnění nejen v oblasti výzkumu, ale také v průmyslové výrobě, a právě proto jí je v současné době věnována velká pozornost. Pomocí technologie elektrostatického zvlákňování je možné vyrobit nanovlákná z různých polymerních materiálů. Nanovlákná mají velký specifický povrch, díky němuž získávají jedinečné vlastnosti. Existuje široká škála aplikací, ve kterých nanovláknenné materiály nacházejí uplatnění. Mezi nejvýznamnější aplikace patří biomedicínské aplikace (nosiče léčiv, prostředky pro hojení ran, tkáňové inženýrství), elektronika, senzory, filtrace, katalyzátory nebo využití v technologiích balení potravin.

Kyselina hyaluronová je lineární vysokomolekulární polysacharid spadající mezi glykosaminoglykany. Je přirozenou součástí lidského těla, nachází se v mnoha jeho částech. Kyselina hyaluronová je netoxická a biologicky odbouratelná, a proto je vhodná pro použití v oblasti biomedicínských aplikací. Kyselinu hyaluronovou je možné chemicky modifikovat za vzniku derivátů, které se mohou lišit některými svými vlastnostmi. Kyselina hyaluronová je hydrofilní, v některých aplikacích je však výhodnější použít hydrofobní materiál, kterým může být právě její derivát.

V současné době dochází k výzkumu a vývoji různých typů nosičů léčiv, které by umožňovaly ovlivňovat množství uvolněného léčiva na určitém místě v závislosti na čase s cílem dosažení co nejvyšší účinnosti podávaného léčiva. Nanovláknenné vrstvy jsou vhodným kandidátem jako nosiče léčiv z důvodu svých jedinečných vlastností (velký specifický povrch, vysoká pórovitost). Léčivo je možné do nanovláknenného nosiče inkorporovat během procesu elektrostatického zvlákňování nebo pomocí adsorpce až po zvlákňování. Různé kinetiky uvolňování léčiva lze dosáhnout především na základě vhodné volby materiálu nanovláknenného nosiče, přičemž důležitou roli hrají také fyzikálně-chemické vlastnosti příslušného léčiva. Nosič by měl být netoxický a biokompatibilní, díky čemuž je možné zvolit např. některé deriváty kyseliny hyaluronové.

Cílem bakalářské práce bylo připravit nanovláknenné vrstvy na bázi derivátů kyseliny hyaluronové pomocí elektrostatického zvlákňování. Do vrstev bylo inkorporováno modelové barvivo chlorofenolová červeň. Pomocí různých metod byly charakterizovány vlastnosti připravených vrstev (morfologie, gramáž, botnavost, zachování nanovláknenné struktury v roztoku fosfátového pufru, enkapsulační účinnost). Byl zjišťován také vliv nanovláknenné

matrice na kinetiku uvolňování barviva pomocí vsádkové metody s dialyzační membránou. Nosiče léčiv na bázi derivátů kyseliny hyaluronové s sebou přinášejí širokou škálu potenciálního využití v oblasti biomedicínských aplikací. Jejich největší potenciál se ukrývá v segmentu hojení ran a tkáňového inženýrství, uplatnění ovšem mohou nalézt i v materiálovém inženýrství. Tato bakalářská práce vznikla ve spolupráci s českou farmaceutickou a kosmetickou společností Contipro a.s., která patří mezi světové lídry ve výrobě a výzkumu kyseliny hyaluronové.

## 2. Elektrostatické zvlákňování

Elektrostatické zvlákňování (ES) je metoda využívající elektrostatické síly k výrobě nanovláken i mikrovláken. Proces je založen na působení stejnosměrného napětí v řádu kV mezi kolektorem a emitorem, díky němuž dochází k tvorbě vláken z polymerního roztoku. Připravená nanovlákná mají velký specifický povrch a jejich průměr se nejčastěji pohybuje v rozmezí 100–500 nm. Výhodou procesu je technická jednoduchost a univerzálnost [1; 2]. K výrobě mohou být použity přírodní i syntetické polymery, polymerní směsi, kovy i keramika. Je možné připravit různé druhy vláknitých struktur (např. porézní vlákna, dutá vlákna, spirálová vlákna, core-shell vlákna). Vlákna mohou být orientovaná náhodně, lze však připravit i vrstvy s uspořádanými vlákny, jejichž některé vlastnosti se mohou lišit. Nanovlákná připravená pomocí procesu ES je možné v závislosti na jejich vlastnostech využívat v mnoha biomedicínských, elektronických a dalších aplikacích (filtrace, senzory, ochranné oděvy, biotechnologie, tkáňové inženýrství, katalyzátory, technologie balení potravin). Proces ES lze různě modifikovat s cílem dosažení požadovaných výsledků. Je také ovlivňován celou řadou parametrů (Obr. 1 a Kap. 2.4.) [3].

### 2.1. Princip a průběh elektrostatického zvlákňování

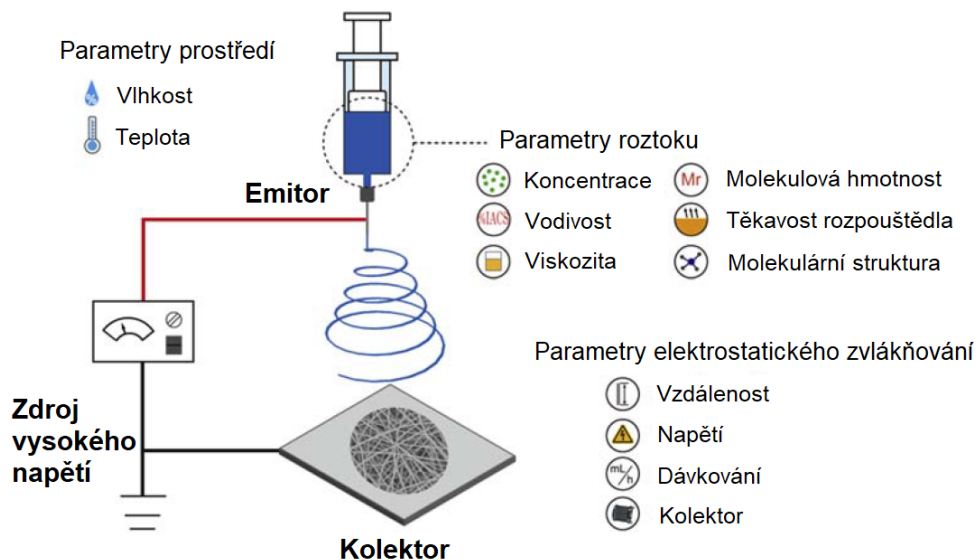
Základní aparatura pro ES (Obr. 1) se skládá ze zdroje vysokého napětí, uzemněného vodivého kolektoru a emitoru, jímž bývá nejčastěji jehla, existují však i bezjehlové emitory (Kap. 2.3.). Celá sestava může být umístěna horizontálně nebo vertikálně. K emitoru, na který je připojeno vysoké napětí, je přiváděn polymerní roztok vzniklý rozpuštěním polymeru v určitém systému rozpouštědel [2]. V důsledku přítomnosti vysokého napětí se kapka roztoku na špičce jehly deformuje do tvaru kužele, který je nazýván Taylorův kužel. Na povrchu kapaliny dochází k indukci elektrického náboje. Se zvyšující se intenzitou elektrostatického pole se indukované náboje na povrchu odpuzují a vytvářejí smykové napětí, které působí proti povrchovému napětí [3].

Po překročení kritického napětí  $V_c$  [V] dochází k narušení rovnováhy. Pro jehlový emitor platí pro toto kritické napětí  $V_c$  vztah:

$$V_c^2 = 4 \frac{H^2}{h^2} \left( \ln \left( \frac{2h}{R} \right) - 1,5 \right) (1,3\pi R\gamma)(0,09), \quad (1)$$

kde  $H$  [m] je vzdálenost kolektoru a emitoru,  $h$  [m] je výška sloupce kapaliny,  $R$  [m] je vnitřní poloměr jehly,  $\gamma$  [N·m<sup>-1</sup>] je povrchové napětí roztoku. Elektrické síly překročí hodnotu povrchového napětí a z vrcholu jehly vytryskne vlákno. Let vlákna (bičování) mezi kolektorem

a emitorem je velmi rychlý a nestabilní. Dochází při něm k odpaření rozpouštědla. Poté je polymerní vlákno zachyceno na povrchu kolektoru [3].



Obr. 1: Schéma elektrostatického zvlákňování a přehled faktorů ovlivňujících elektrostatické zvlákňování [3].

Proces ES je možné modifikovat mnoha způsoby. Wang et al. (2020) proces ES modifikovali ponořením kolektoru a špičky jehly do lázně (hexanu). Pro formaci vláken využili fázovou separaci látek místo těkavosti organického rozpouštědla. Molekuly rozpouštědla se v průběhu procesu vyměňovaly s molekulami lázně, které nejsou rozpouštědlem. Tím se polymer vysrážel z roztoku a vlákno ztuhlo. Proces může být v mnohých případech ekologičtější, protože není nutné používat toxická organická rozpouštědla. Velkou výhodou tohoto procesu je možnost kontroly vlhkosti a teploty v průběhu procesu vláknění, přičemž tyto dva parametry jsou pro proces ES důležité a budou diskutovány v následující kapitole [4].

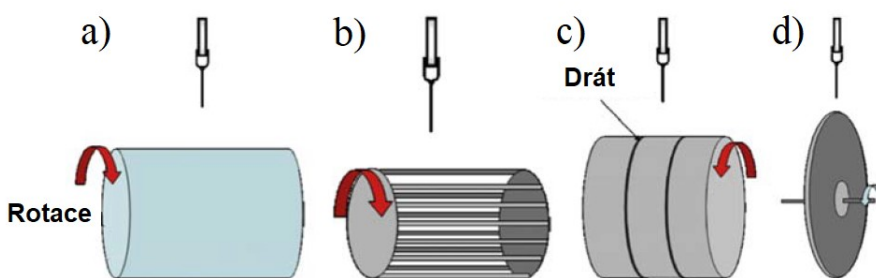
Elektrostatické zvlákňování s asistencí vzduchu (electroblowing, EB) je také jednou z modifikací procesu ES. V tomto případě je v blízkosti jehly umístěn zdroj proudícího vzduchu. Proudící vzduch působí na formující se vlákno. Molekuly odpařujícího se rozpouštědla jsou v proudu vzduchu unášeny pryč. Dochází ke snížení jejich parciálního tlaku, což zvyšuje rychlost odpařování rozpouštědla. Rychlejší odpařování umožňuje zvýšení dávkování polymerního roztoku, což vede k vyšší produkci nanovláken. Pokorný et al. (2016) porovnávali proces EB s klasickým procesem ES. Oběma způsoby vláknil roztok kyseliny hyaluronové (HA) s polyethylenoxidem (PEO). Produkce nanovláken metodou EB byla výrazně vyšší. Produkce se zvyšovala s rostoucí rychlostí proudění vzduchu, s rostoucí teplotou vzduchu a se snižující se relativní vlhkostí vzduchu [5].

## 2.2. Kolektory

Kolektor slouží k zachytávání vytvořených vláken, obvykle je pokryt substrátem. Kolektor musí být dostatečně vodivý. Pokud je kolektor málo vodivý, zbytkové náboje přítomné ve vláknech nemohou být dobře odvedeny, čímž dochází k odpuzování dalších vláken a snížení produktivity. Depozici vláken ovlivňují i malé rozdíly elektrického pole na povrchu kolektoru. Aby bylo možné vláknit na méně vodivý či nevodivý povrch, je nutné snížit množství zbytkového náboje ve vláknech jiným způsobem. Toho je možné dosáhnout např. použitím vysokého střídavého napětí místo stejnosměrného. Typ kolektoru ovlivňuje uspořádání vláken a strukturu výsledné nanovláknenné vrstvy. Má vliv i na množství vláken, která na něm mohou být zachycena. Kolektory mohou být statické (nepohyblivé) nebo rotační [3].

### 2.2.1. Rotační kolektory

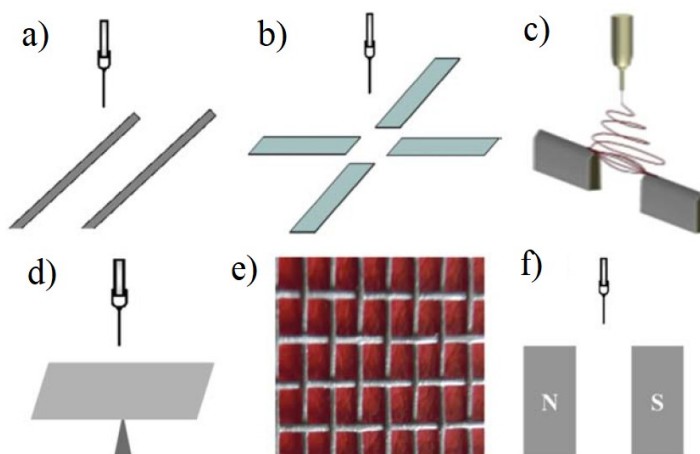
Rotační kolektory je možné využít pro přípravu orientovaných nanovláken, která mohou mít odlišné vlastnosti od nanovláken náhodně uspořádaných. Bylo prokázáno, že na míru orientace nanovláken může mít vliv rychlost otáčení kolektoru. Při nižších rychlostech je orientace náhodná, při vyšších rychlostech se začínají tvořit orientovaná nanovlákná. Orientaci vláken však může ovlivnit i vzduchová turbulence způsobená rotací kolektoru, která se dá snížit použitím vzduchového štítu [3]. Krishnamoorthy et al. (2011) navrhli vzduchový štít, který se skládal z nevodivých bloků umístěných kolem rotačního disku, který byl použit jako kolektor. Správné uspořádání bloků umožnilo odvést proudění vzduchu způsobené rotací kolektoru [6]. Existuje mnoho typů rotačních kolektorů, které ovlivňují vlastnosti připravených nanovláknenných vrstev. Na Obr. 2 jsou některé z nich znázorněny [3].



Obr. 2: Rotační kolektory a) rotační válec, b) válec vytvořený z drátů, c) válec s namotaným drátem, d) rotační disk [3].

### 2.2.2. Statické kolektory

Některé statické kolektory umožňují tvorbu nanovláknenných vrstev s orientovanými vlákny díky speciálnímu uspořádání. K vysoce uspořádaným vláknům vede např. soustava paralelních elektrod (Obr. 3 a), b)). Na mřížkovém kolektoru (Obr. 3 e)) je možné vytvořit vrstvy, které mají v různých částech rozdílnou hustotu vláken. K ovlivnění procesu ES je možné také využít magnetické pole. Kolektorem mohou být v tomto případě např. paralelní magnety (Obr. 3 f)). Dochází k vytvoření orientovaných nanovláken obsahujících magnetické nanočástice [3].



Obr. 3: Statické kolektory a), b), c) různě uspořádané elektrody, d) kolektor s kovovým hrotem, e) mřížkový kolektor, f) magnety jako kolektor [3].

### 2.3. Emitory

Emitor slouží k dávkování polymerního roztoku během procesu ES. Existuje mnoho druhů emitorů, které se dělí na jehlové a bezjehlové. Rozdíly mezi těmito emitory jsou hlavně v produktivitě a použitém napětí. Jehlový emitor má poměrně nízkou produktivitu oproti bezjehlovému emitoru z důvodu nižšího dávkování roztoku jen jednou jehlou. Potřebné napětí ke zvlákňování je také ovlivněno typem emitoru. Bezjehlový emitor nebo emitor skládající se z více jehel potřebuje vyšší napětí oproti samotné jehle, protože je napětí rozloženo na větší ploše. Oba typy emitorů mohou být stacionární i pohyblivé [3; 7; 8].

Typ emitoru ovlivňuje také homogenitu tloušťky připravené vrstvy, což je důležitý faktor hlavně pro průmyslovou výrobu. Samotné vláknění může probíhat směrem nahoru i dolů. Uspořádání aparatury s emitorem ve spodní části je výhodnější, protože nedochází ke kapání přebývajícího roztoku na již vytvořená nanovláknena [3; 7; 8].



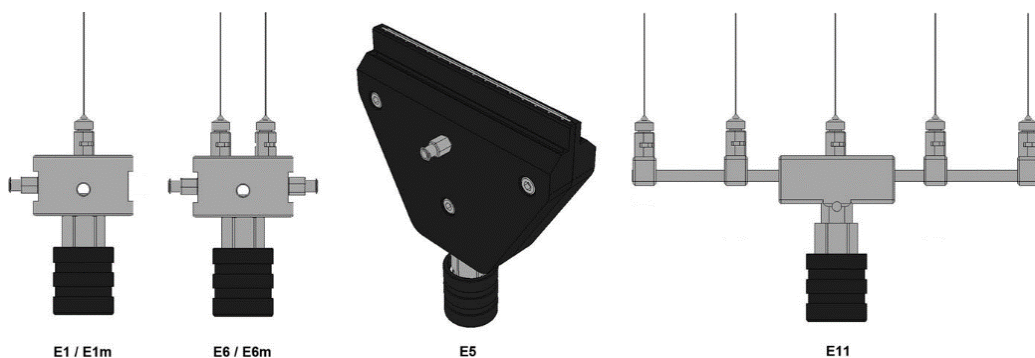
### 2.3.1. Jehlové emitory

Jehla je často vyráběna z nerezové oceli, která může být potažena jinou látkou. U jehlových emitorů je vhodnější plochý hrot, protože poskytuje rovný povrch pro vytvoření stabilního Taylorova kužele. Vycházející vlákno poté méně osciluje. Nevýhodou použití jehly, jak bylo zmíněno výše, je nízká produktivita (méně než  $300 \text{ mg} \cdot \text{h}^{-1}$  na 1 jehlu), což omezuje možnosti používání v průmyslu [3]. Zvýšení produktivity lze dosáhnout použitím emitoru s více jehlami. Použití horizontálně se pohybujícího emitoru skládajícího se ze dvou jehel vede ke zvýšení produktivity oproti jedné jehle a pohyb také přispívá k vytvoření homogenní tloušťky vrstvy [8].

### 2.3.2. Bezjehlové emitory

Bezjehlové ES probíhá z otevřeného povrchu kapaliny. Morfologie vláken je ovlivněna tvarem trysky i profilem intenzity elektrického pole kolem trysky. Obvykle bývá tryska symetrická, což umožňuje vytvoření rovnoměrného elektrického pole kolem trysky, které vede ke tvorbě homogenních vláken [3; 7].

Bezjehlové ES může probíhat se stacionárním nebo pohyblivým emitorem. Mezi pohyblivé emitory patří rotační emitory, které bývají částečně ponořeny do roztoku polymeru. Rotace trysek potom umožňuje dopravit roztok do míst, kde probíhá zvláknování, a proto může výroba probíhat kontinuálně. Při použití stacionárních emitorů se často využívá i jiná síla (magnetická síla, gravitace, vysoký tlak plynu) v průběhu procesu ES. Např. emitor využívající magnetické pole pro iniciaci procesu má produktivitu až  $12 \text{ g} \cdot \text{h}^{-1}$  [3; 7]. Na Obr. 4 jsou znázorněny některé typy emitorů [8].



Obr. 4: Schématické znázornění některých typů emitorů [8].

## 2.4. Faktory ovlivňující elektrostatické zvlákňování

Přehled faktorů, které ovlivňují ES, je zobrazen na Obr. 1.

### 2.4.1. Parametry elektrostatického zvlákňování

Napětí mezi kolektorem a emitorem má vliv na proces ES, protože napětí zajišťuje přítomnost elektrického náboje v kapce roztoku. Proces ES začne probíhat až po překročení kritického napětí (Kap. 2.1.). Nepřiměřené zvýšení napětí ovšem může vést k nestabilitě procesu a k tvorbě defektů. Přikládané napětí může ovlivňovat průměr nanovláken. Avšak vývoj závislosti průměru nanovláken při zvyšování napětí není zcela jednoznačný (výsledky experimentů nejsou jednotné), protože proces současně ovlivňuje i celá řada dalších parametrů [2; 3; 9].

Vzdálenost mezi kolektorem a emitorem ovlivňuje dobu, po kterou je vlákno v bičující zóně mezi nimi. vzdálenost musí být dostatečná, aby se stihlo během vláknění odpařit všechno rozpouštědlo. Při konstantním napětí je intenzita elektrického pole nepřímo úměrná vzdálenosti. Bylo pozorováno, že při zvětšování vzdálenosti se nejprve zmenšoval průměr nanovláken z důvodu lepšího natahování vláken. S dalším nárůstem se ale průměr začal zvětšovat z důvodu oslabení elektrického pole [2; 3].

Během procesu ES musí být udržována optimální rychlost dávkování, aby byla rovnováha mezi přiváděným a odebíraným roztokem. Distribuce průměrů nanovláken je v případě rovnováhy nejužší. Při velké rychlosti dochází k tvorbě defektů a k přetékání roztoku, který se nestačí zvláknit. Naopak při nízké rychlosti může dojít k zániku Taylorova kužele a k přerušení vláknění [3].

### 2.4.2. Parametry roztoku

Morfologii a průměr vláken ovlivňuje koncentrace polymerů v roztoku. Pro správný průběh ES je nutné zvolit optimální koncentraci. Při příliš nízké koncentraci polymerů dochází k tvorbě korálků, jejichž tvar se mění s rostoucí koncentrací na vřetenový a při optimální koncentraci vznikají stejnoměrná vlákna. Příliš vysoká koncentrace zase znesnadňuje plynulý průtok roztoku emitorem [2; 10].

Viskozita roztoku může ovlivňovat morfologii a průměr vláken. Viskozita je dána hlavně přitažlivými silami mezi molekulami. Rayleighova nestabilita je způsobena tím, že při dosažení určitého povrchového napětí mají kapaliny tendenci zmenšovat svůj povrch a vytvářet kapičky. Viskoelastické síly působí proti povrchovému napětí. Pomáhají udržet vláknennou strukturu

a odolávat změnám tvaru vlákna. Příliš nízká viskozita může způsobit přerušení souvislého zvláknování a tvorbu korálků, protože malé viskoelastické síly nedokážou zabránit tvorbě korálků v důsledku Rayleighovy nestability. S rostoucí viskozitou se obvykle začínají vytvářet stejnoměrná vlákna s rostoucím průměrem, protože je zabráněno většímu natahování vláken z důvodu vyšších viskoelastických sil. Optimální rozsah viskozity se liší pro různé polymery [2; 11]. Fong et al. (1999) studovali vliv viskozity PEO na morfologii vláken v rozsahu 0,013–1,9 Pa·s. S rostoucí viskozitou se snižovalo množství vytvořených korálků, viskozita mezi 1,25 až 1,9 Pa·s byla pro vláknění PEO nejvhodnější [12].

Existuje také optimální rozsah pro povrchové napětí při konstantních hodnotách ostatních parametrů. Povrchové napětí působí proti elektrostatickým silám, které vedou k tvorbě vláken. Pro zahájení procesu ES je nutné překonat povrchové napětí. V oblasti letu vlákna určuje zakřivení vlákna rovnováha mezi povrchovým napětím a elektrostatickými silami. Povrchové napětí závisí na složení rozpouštědlového systému. Při nižším povrchovém napětí dochází k větší interakci mezi polymerem a molekulami rozpouštědla a nedochází ke vzniku korálků. Vysoké povrchové napětí může způsobit tvorbu korálků, protože se molekuly rozpouštědla mají tendenci shromažďovat. Může se také vytvořit nestabilní tryska, díky čemuž může být proces vláknění přerušen [2; 9; 10].

Těkavost rozpouštědla musí být také v určitém optimálním rozsahu. Těkavost daného rozpouštědla závisí na vnějších podmínkách. V ideálním případě by se mělo všechno rozpouštědlo odpařit dříve, než vlákno dosáhne kolektoru. Pokud by byla těkavost rozpouštědla nízká, nestihlo by se během vláknění všechno rozpouštědlo vypařit. Mokrá vlákna by se mohla spojovat a nevytvořila by se požadovaná nanovláknenná struktura. Při vysoké těkavosti by docházelo k předčasnému zasychání roztoku v jehle, čímž by mohl být proces ES přerušen [3; 9].

Elektrická vodivost závisí na použitém polymeru, rozpouštědlech a případném přídavku iontových solí do roztoku. V průběhu procesu ES dochází k přenosu elektrického náboje z elektrody na kapku roztoku. Proto je nutná určitá minimální vodivost roztoku, aby byl proces ES možný [9]. Se zvyšující se vodivostí klesá průměr vláken a množství korálků. Příliš vysoká vodivost způsobuje nestabilitu roztoku v silném elektrickém poli a širokou distribuci průměrů vláken [2; 3]. Zong et al. (2002) studovali vliv přidání různých solí ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  a  $\text{NaCl}$ ) do roztoku kyseliny polymléčné na výsledná nanovlákna. Přidáním soli do roztoku se zvýšila hustota náboje na povrchu kapky a tím i síly působící na kapku v elektrickém poli. Vlákna byla

proto tenčí a korálky se zmenšovaly. Po přidání 1 hm. % soli již nedocházelo k tvorbě korálek oproti vláknění roztoků bez soli. Na průměr vláken měla vliv velikost iontů. Ionty s menším poloměrem mají vyšší hustotu náboje a tím i pohyblivost. Na roztok v tomto případě působily větší síly, čímž docházelo ke vzniku tenčích vláken. Proto průměr nanovláken kyseliny polymléčné s přidáním NaCl byl 210 nm a s přidáním  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1000 nm [13].

Molekulová hmotnost polymeru ovlivňuje viskozitu, povrchové napětí a vodivost roztoku, které následně ovlivní proces ES. Dostatečně velká molekulová hmotnost zajišťuje potřebné intermolekulární interakce ve vláknech. Při vyšších hodnotách molekulové hmotnosti bývá také optimální viskozita roztoku. Při nízké molekulové hmotnosti se vytvářejí korálky, které s rostoucí molekulovou hmotností ubývají [2; 10].

#### *2.4.3. Parametry prostředí*

Proces ES ovlivňují také parametry prostředí jako je teplota a vlhkost. Při vyšší teplotě dochází k rychlejšímu odpařování rozpouštědla a vytvářejí se tak vlákna s menším průměrem, což může být způsobeno současným snížením viskozity roztoku [2; 3].

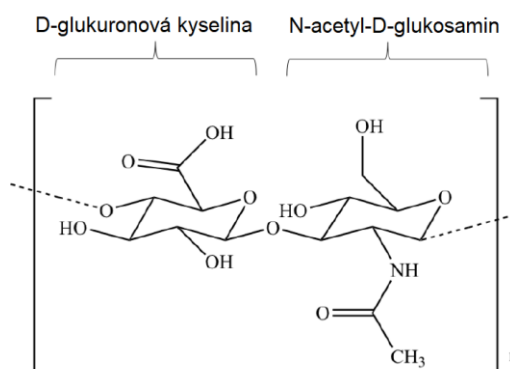
Relativní vzdušná vlhkost zásadním způsobem ovlivňuje schopnost odpařování rozpouštědla z polymerního roztoku v průběhu procesu vláknění. Často se uvádí, že změny vlhkosti mají vliv na průměr vláken. Tato závislost však není zcela jednoznačná. Huang et al. (2011) sledovali závislost vlhkosti na průměru vytvořených nanovláken z polyakrylonitrilu. Průměr nanovláken se zvýšil ze 150 nm při 0 % relativní vlhkosti na 630 nm při 60 % relativní vlhkosti. Mohlo to být způsobeno tím, že díky vyššímu tlaku vodní páry při vyšší vlhkosti se v prostoru nacházelo více molekul vody, které snížily množství přebytečného náboje v kapce v důsledku molekulární polarizace. Tím se snížila intenzita elektrického pole a na kapku působila menší elektrická síla [14]. De Vrieze et al. (2009) se zabývali závislostí vlhkosti na průměru nanovláken z polyvinylpyrrolidonu (PVP). Průměr nanovláken se vzrůstající vlhkostí klesal. Při určité vlhkosti se vlákna začala spojovat, a při relativní vlhkosti 60 % již žádná nevznikala. Při nižší koncentraci PVP vlákna nevznikala již při nižší vlhkosti z důvodu nutnosti odpaření většího množství rozpouštědla. Roztok PVP v ethanolu absorbuje vodu, což při vyšší vlhkosti způsobí, že se vlákno nestihne v průběhu procesu vysušit [15].

### 3. Kyselina hyaluronová a její deriváty

#### 3.1. Kyselina hyaluronová

##### 3.1.1. Chemická struktura

Kyselina hyaluronová (HA) je lineární polysacharid patřící do skupiny glykosaminoglykanů. Skládá se z opakujících se disacharidových jednotek složených z kyseliny  $\beta$ -1,4-D-glukuronové a  $\beta$ -1,3-N-acetyl-D-glukosaminu, které jsou spojeny  $\beta$ -1,3 a  $\beta$ -1,4-glykosidovými vazbami. Chemická struktura je znázorněna na Obr. 5 [16; 17]. Průměrná délka disacharidu je 1 nm a jeho chemická struktura je energeticky velmi stabilní. V roztoku mají řetězce polymeru spirálovitou strukturu (strukturu cívky), která je způsobená vodíkovými vazbami mezi hydroxylovými skupinami [18].



Obr. 5: Chemická struktura kyseliny hyaluronové [19].

##### 3.1.2. Biologické vlastnosti

Kyselina hyaluronová je biologicky odbouratelná a velmi hydrofilní. Vysoká smyková viskozita HA umožňuje její fungování jako mazivo pro tkáně v lidském těle, protože zlepšuje kluzkost mezi nimi [18]. Díky značné absorpci vody zlepšuje také pružnost tkáně [20].

Kyselina hyaluronová se ve formě soli nachází v mezibuněčné hmotě v celém lidském těle, je součástí očního sklivce, pupeční šňůry, plic, ledvin, mozku a svalových tkání. V extracelulárních pojivových tkáních tvoří základ pro vazbu jiných glykosaminoglykanů a proteoglykanů, na něž je navázána prostřednictvím specifických interakcí HA-protein. Kyselina hyaluronová je tedy biologicky aktivní, podílí se na buněčné signalizaci, morfogenezi a organizaci hmoty [16; 17; 18]. Pomáhá také při růstu buněk epitelových tkání a při hojení ran. Při procesu hojení ran má velký vliv relativní molekulová hmotnost látky. HA s vysokou molekulovou hmotností podporuje vznik drobných fragmentů, které vytvářejí vazby během

poranění a zajišťují celistvost tkáně [20]. Průměrně tělo dospělého člověka obsahuje asi 15 g HA, z čehož je denně obnovováno 33 %. Její molekulová hmotnost v těle se pohybuje od 100 do 5 000 kg·mol<sup>-1</sup> [17].

### 3.1.3. Syntéza

Buněčná syntéza HA v těle probíhá za pomoci enzymu hyaluronan syntázy. Do rostoucího polymerního řetězce jsou střídavě přidávány molekuly kyseliny glukuronové a *N*-acetylglukosaminu. K syntéze se používají jejich aktivované nukleotidové cukry [18].

V průmyslu se kyselina hyaluronová získává nejčastěji mikrobiální fermentací. Výsledná HA je biokompatibilní s lidským tělem. Z mikroorganismů se často používají různé kmeny streptokoků (skupina A a C). Optimální podmínky procesu jsou při teplotě 37 °C, pH 7 a přítomnosti laktózy nebo sacharózy. Do rodu streptokoků spadají i druhy, které působí jako patogeny pro člověka. Pokud se pro přípravu využívají tyto druhy, je nutné čištění produktu HA, které je poměrně nákladné. Proto jsou zkoumány další mikroorganismy (bakterie, kvasinky) i rostlinné buněčné kultury schopné produkovat HA, které nejsou patogenní a mají kvalitní výtěžek [19]. Např. firma Contipro a. s. využívá k přípravě kyseliny hyaluronové bakterie *Streptococcus zooepidemicus equi*, které jsou již zbaveny patogenů [21].

## 3.2. Deriváty kyseliny hyaluronové

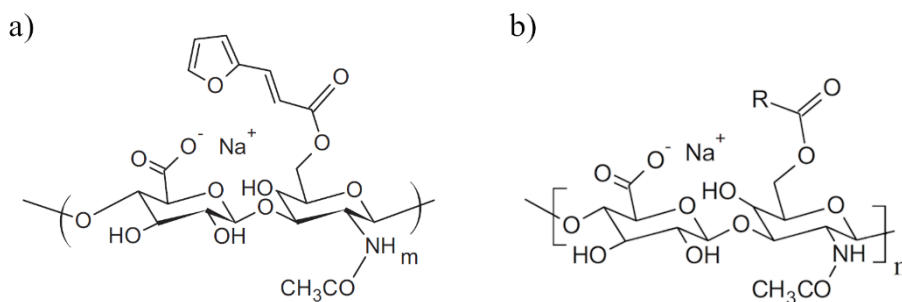
Kyselina hyaluronová může být chemicky modifikována různými způsoby. Výsledné deriváty mají odlišné vlastnosti a nacházejí uplatnění v dalších aplikacích. Může být upravena biologická aktivita, výsledný derivát může být hydrofobní. Chemické modifikace probíhají hlavně na karboxylové skupině, primární a sekundární hydroxylové skupině a *N*-acetylové skupině. Dle modifikace HA poté vznikají např. ethery, estery, amidy nebo thiohy kyseliny hyaluronové. Deriváty se dělí na 2 skupiny. Terminálně modifikované tzv. monolitické deriváty, které nemohou v přítomnosti buněk nebo tkání vytvářet nové chemické vazby. Druhou skupinu tvoří deriváty, které v přítomnosti buněk nebo tkání mohou vytvářet kovalentní vazby. Pro klinické aplikace musí být zajištěna biokompatibilita připravených derivátů [16]. V následujících podkapitolách jsou zmíněny deriváty furanyl hyaluronan a lauroyl hyaluronan z důvodu použití v praktické části bakalářské práce.

### 3.2.1. Furanyl hyaluronan

Derivát furanyl hyaluronan (F-HA) byl připraven esterifikací HA. Kyselina 3-(2-furyl)akrylová byla aktivována benzoylchloridy (2,4,6-trichlorbenzoyl chlorid a benzoylchlorid) za vzniku směsného anhydridu, který reagoval s hydroxylovou skupinou HA za vzniku esteru. Chemická struktura je znázorněna na Obr. 6 a). F-HA o stupni substituce 5 až 20 % je vhodnější pro elektrostatické zvláknování než čistá kyselina hyaluronová z důvodu nižší viskozity, pro F-HA s vyšším stupněm substituce byla naměřena zase vyšší viskozita. F-HA je rozpustný ve vodě, a proto může být zvláknován spolu s PEO ve vodném roztoku bez použití toxických organických rozpouštědel. PEO zlepšuje schopnost tvorby vláken. Výsledná nanovlákná jsou homogenní s hladkým povrchem bez strukturních vad. Po osvětlení F-HA UV zářením dojde k zesítnění a F-HA se stane hydrofobním. Připravenou nanovláknennou vrstvu je takto možné zesítovat za vzniku materiálu nerozpustného ve vodě [22].

### 3.2.2. Lauroyl hyaluronan

Derivát lauroyl hyaluronan (L-HA) byl připraven esterifikací hydroxylových skupin kyseliny hyaluronové. Hydroxylová skupina HA reagovala se symetrickým anhydridem kyseliny laurové za katalýzy *N,N*-dimethylaminopyridinem a došlo tak ke vzniku esteru. Chemická struktura L-HA je znázorněna na Obr. 6 b). Výsledný derivát L-HA je nerozpustný ve vodě, je hydrofobní. Hydrofobicita derivátů stoupá se stupněm substituce, protože molekuly obsahují větší počet hydrofobních řetězců kyseliny laurové. L-HA je však rozpustný ve směsi destilované vody a isopropylalkoholu (IPA). Minimální procento IPA nutné pro rozpuštění L-HA je závislé na stupni substituce. S rostoucím stupněm substituce (rostoucí hydrofobicitou) roste potřebné množství IPA ve směsi [23].



Obr. 6: Chemická struktura a) F-HA [22], b) L-HA, kde R je  $(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_3$  [23].

### 3.3. Elektrostatické zvlákňování kyseliny hyaluronové a jejich derivátů

Kyselina hyaluronová je netoxická a biologicky odbouratelná, proto je výhodné ji použít k přípravě nanovláknenných vrstev pro biomedicínské aplikace. Vodné roztoky HA jsou vysoce viskózní, což může ztížit nebo i znemožnit proces ES. Kyselina hyaluronová je proto z vodného roztoku často vlákněna za pomoci jiné polymerní složky (nejčastěji syntetický polymer) nebo jsou využity systémy rozpouštědel upravující vlastnosti výchozího roztoku (viz následující odstavec). I přesto, že přístupů k tvorbě nanovláken z HA bylo vyzkoušeno již relativně mnoho, je často obtížné vytvořit vlákna s úzkou distribucí průměrů. Kyselina hyaluronová má také schopnost absorbovat vodu. Proto se v průběhu zvlákňování nemusí stihnout odpařit všechno rozpouštědlo, což může vést k defektům na vláknech [2; 3].

Liu et al. (2011) se zabývali vlivem rozpouštědla na vláknění HA. Vláknění HA při použití deionizované vody jako rozpouštědla nebylo úspěšné. Nejlépe proces probíhal při použití kombinace deionizované vody, kyseliny mravenčí a *N,N*-dimethylformamidu (DMF). V tomto případě měl roztok optimální vlastnosti jako vodivost a povrchové napětí. Průměr připravených vláken byl poměrně malý. Dle obrazové analýzy ze skenovacího elektronového mikroskopu (SEM) mělo 70 % vláken průměr 30 až 50 nm [24].

Ahire et al. (2017) zvlákňovali směs polyethylenoxidu (PEO) a kyseliny hyaluronové z vodného roztoku. Koncentrace HA byla měněna. Byl sledován vliv relativní vlhkosti vzduchu na připravená nanovláknena. PEO je biokompatibilní a netoxický syntetický polymer, a proto je vhodný např. pro aplikace na hojení ran. V některých případech byl do vláknícího roztoku přidán také kanamycin (antibiotikum), který tak byl ve výsledku inkorporován do nanovláknenné vrstvy. Obsah HA v připravených roztocích byl 0,1–0,3 % (hmotnostně-objemová procenta) a obsah PEO byl vždy 12 % (hmotnostně-objemová procenta). Při nižší vlhkosti (30–35 %) se průměr nanovláken s rostoucí koncentrací HA zvyšoval, což mohlo být způsobeno zvyšováním viskozity roztoku díky většímu obsahu HA. Při vyšší vlhkosti (50–55 %) se na nanovláknenech tvořily korálky. Rychlost odpařování rozpouštědla byla v tomto případě nižší, což vedlo k tvorbě tenčích nanovláken. Přidání kanamycinu vedlo k tvorbě vláken bez korálků i při vyšší vlhkosti. Oproti zvlákňování bez kanamycinu byl jejich průměr menší, autoři tento efekt přisuzují snížení viskozity po přidání kanamycinu [25].

Roztoky derivátů HA mohou zlepšit efektivitu procesu ES oproti vláknění čisté HA z důvodu odlišných vlastností (např. mohou mít nižší viskozitu). Huerta-Angeles et al. (2016) zvlákňovali derivát F-HA s PEO v hmotnostním poměru 80:20 v destilované vodě. Byl použit



bezjehlový emitor a vysoké napětí 75-82 kV. Výsledná nanovlákná byla homogenní s hladkým povrchem, bez strukturních vad a měla průměr 200 nm [22].

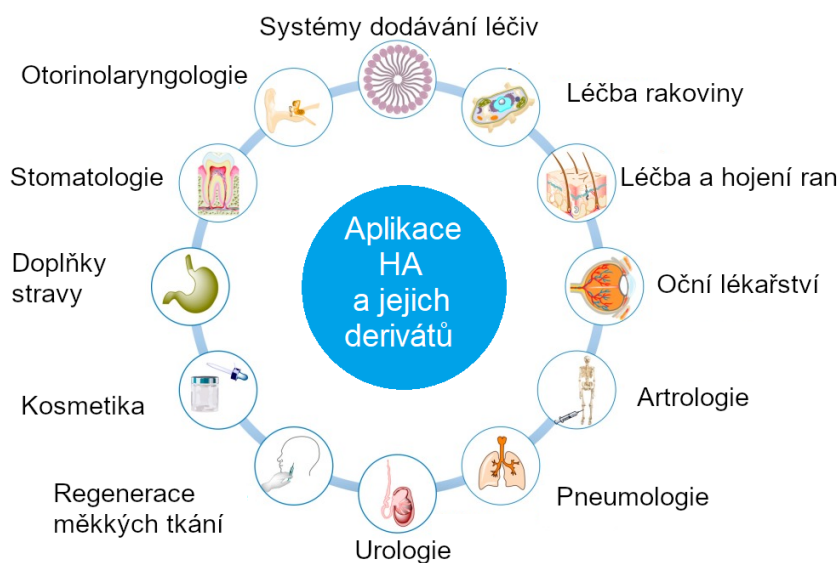
Ji et al. (2006) zvlákňovali thiol derivát kyseliny hyaluronové společně s PEO a poly(ethylen glykol)diakrylátem (PEGDA). Aparatura pro ES byla tvořena dvěma injekčními stříkačkami (jedna s roztokem thiolu HA a PEO, druhá roztokem PEGDA), po jejich smíchání ihned probíhalo zvlákňování. PEO byl použit z důvodu snížení viskozity roztoku, což usnadnilo proces ES. Po skončení procesu byl odstraněn za pomoci ponoření vrstvy do deionizované vody na 24 h. PEGDA sloužil jako činidlo pro zesílení vláken. Výsledný průměr vláken po hydrataci (odstranění PEO) byl 110 nm. Nanovláknenná struktura po hydrataci byla zachována. Potenciální aplikací výsledné nanovláknenné vrstvy je hojení ran [26].

### **3.4. Využití kyseliny hyaluronové a jejích derivátů**

Kyselina hyaluronová i její deriváty nachází uplatnění v mnoha biomedicínských i kosmetických (HA podporuje hydrataci pleti) aplikacích z důvodu jejich jedinečných biologických a fyzikálně-chemických vlastností [19]. Kyselinu hyaluronovou i její deriváty je možné využít např. k výrobě nanovláknenných vrstev obsahujících aktivní látky. Při styku nanovláknenných vrstev z nativní HA s vodou dochází k jejich rychlé degradaci, protože HA je hydrofilní. Toho se využívá v aplikacích, ve kterých je potřeba rychlý účinek (okamžité uvolnění léčiva). V některých aplikacích je potřeba docílit déletrvajícího účinku (postupné uvolnění léčiva), k čemuž je potřeba pomalejší degradace nanovláknenné vrstvy, které lze dosáhnout např. použitím derivátů kyseliny hyaluronové [22; 27]. Nanovláknenné vrstvy HA i jejích derivátů je možné využít jako nosiče léčiv (protinádorové, protizánětlivé, anestetika). Léčiva mohou být vázána k nosiči kovalentní nebo nekovalentní vazbou. Systémy nosičů léčiv nacházejí uplatnění v oblasti očního lékařství, transdermálního podávání léčiv nebo pro léčbu rakoviny [28; 27]. Jako potencionální nosič léčiv byl připraven např. derivát HA vytvořený modifikací s hydrazidem, který vykazuje odlišné fyzikálně-chemické vlastnosti oproti nativní HA [29].

Zesíťované formy kyseliny hyaluronové se využívají jako výplňové formy (implantáty) k léčbě např. v chirurgii. V plastické chirurgii je HA vhodná pro konturování měkkých tkání (vyplnění vrásek na pokožce), protože má schopnost absorbovat vodu a obnovuje objem tkáně. Další využití nachází v oblasti hojení ran [30; 28]. Chanda et al. (2018) připravili dvojvrstvý materiál tvořený vrstvou HA a vrstvou chitosanu a polykaprolaktonu, který se jeví jako vhodný potenciální materiál pro hojení ran [31]. Kyselinu hyaluronovou je možné využít k léčbě

osteoartrózy. Díky své viskoelasticitě je vhodná jako mazivo pro klouby a je přirozenou součástí synoviální tekutiny, která snižuje tření kloubů. Jako součást očních kapek se HA využívá také k léčbě syndromu suchého oka a je vhodná i pro kontaktní čočky, protože napomáhá hydrataci očí [28; 19]. Laffleur et al. (2015) připravili derivát cystein ethylester kyseliny hyaluronové, který vykazoval lepší vlastnosti pro využití v očních kapkách než nativní HA [32]. HA je také součástí přípravků pro léčbu respiračních onemocnění (např. nosní sprej k léčbě rýmy a podpoře hojení nosních ran) [19]. Na Obr. 7 jsou znázorněny možnosti využití kyseliny hyaluronové a jejích derivátů.



Obr. 7: Přehled využití kyseliny hyaluronové a jejích derivátů [19].

## 4. Uvolňování aktivních látek

Jedním ze současných trendů v medicíně je vývoj nových systémů pro dodávání léčiv. Jedná se o prostředky umožňující zavedení a uvolňování léčivé látky v těle člověka. Díky přesnému určení místa působení a doby uvolňování lze dosáhnout lepší efektivity podávané látky. Systémy se skládají z vlastního léčiva a jeho nosiče a mohou mít různou formu (např. nanočástice, nanovláknenné matrice nebo micelární systémy). Díky různým kombinacím léčiva (např. antibiotika – ciprofloxacin, metronidazol; antiflogistika – ibuprofen, aspirin [33]; antiseptika – chlorhexidin [34]; chemoterapeutika k léčbě nádorových onemocnění [35]) a nosiče je možné vytvořit systémy s rozdílnými vlastnostmi [36; 3; 37].

Nosiče léčiv by měly být netoxické a biokompatibilní, aby nedocházelo k nežádoucím reakcím při styku s lidským tělem. V případě vnitřního užití by měly být také biologicky odbouratelné, aby materiál nemusel být chirurgicky odstraňován. Zároveň by však měly chránit léčivo během případného transportu do cílového místa před nepříznivými vlivy okolního prostředí (např. před působením látek způsobujících degradaci molekul léčiva). Nanovláknenné materiály jsou v této oblasti používány zejména pro své jedinečné fyzikální a chemické vlastnosti. Mají velký specifický povrch, vysokou pórovitost a nízkou hustotu, což jsou prospěšné vlastnosti pro inkorporaci a uvolňování léčiv. [36; 3; 37]. Nanovláknenné systémy pro distribuci léčiv je možné využít např. pro léčbu nádorových onemocnění [38], oční podávání léčiv [39], orální podávání léčiv [40] nebo pro topické hojení ran [41].

Léčiva je možné do nanovláknenného nosiče inkorporovat pomocí různých metod, těm je blíže věnována Kap. 4.2. V závislosti na metodě inkorporace může mít uvolňování léčiva z nosiče různý průběh. Průběh je charakterizován profilem uvolňování daného léčiva, což je závislost uvolněného léčiva na čase. Nosičové systémy jsou často vyvíjeny za účelem tento profil ovlivnit a získat tak systém s řízeným uvolňováním léčiva. V některých systémech může docházet k uvolnění velkého množství léčiva najednou při jeho podání (tzv. „burst“ efekt). Některé systémy umožňují dlouhodobé postupné uvolňování. Uvolňování léčiva je možné také spustit na základě určitého podnětu. Na kinetiku uvolňování a celkové množství uvolněného léčiva má vliv mnoho faktorů (Kap. 4.2. a 4.3.). K předpovídání profilů uvolňování léčiv je možné využít různé matematické modely (Kap. 4.4.) [36; 3; 37].

#### **4.1. Řízené uvolňování aktivních látek a jeho mechanismy**

Řízené uvolňování umožňuje ovlivnit rychlost i celkovou dobu uvolňování a regulovat tak koncentraci léčiva v cílové tkáni nebo krvi. Řízeným uvolňováním lze dosáhnout požadovaného profilu uvolňování léčiva, který je nejefektivnější pro daný případ aplikace léčiva. Obecně se kinetika uvolňování může řídit rychlostí nultého nebo prvního řádu a nemusí být v průběhu uvolňování stále stejná. Existuje několik mechanismů, které umožňují řídit uvolňování léčiva. Patří mezi ně např. difúze, osmóza, botnání nebo degradace matrice. V systému uvolňování je často uplatněn více než jeden z nich. Ve vodných roztocích dochází obvykle k difúzi hydrofilního léčiva, naopak u hydrofobního léčiva se uplatňuje botnání nebo degradace matrice. Difúze patří mezi nejdůležitější mechanismy a byla uplatněna v praktické části bakalářské práce [42].

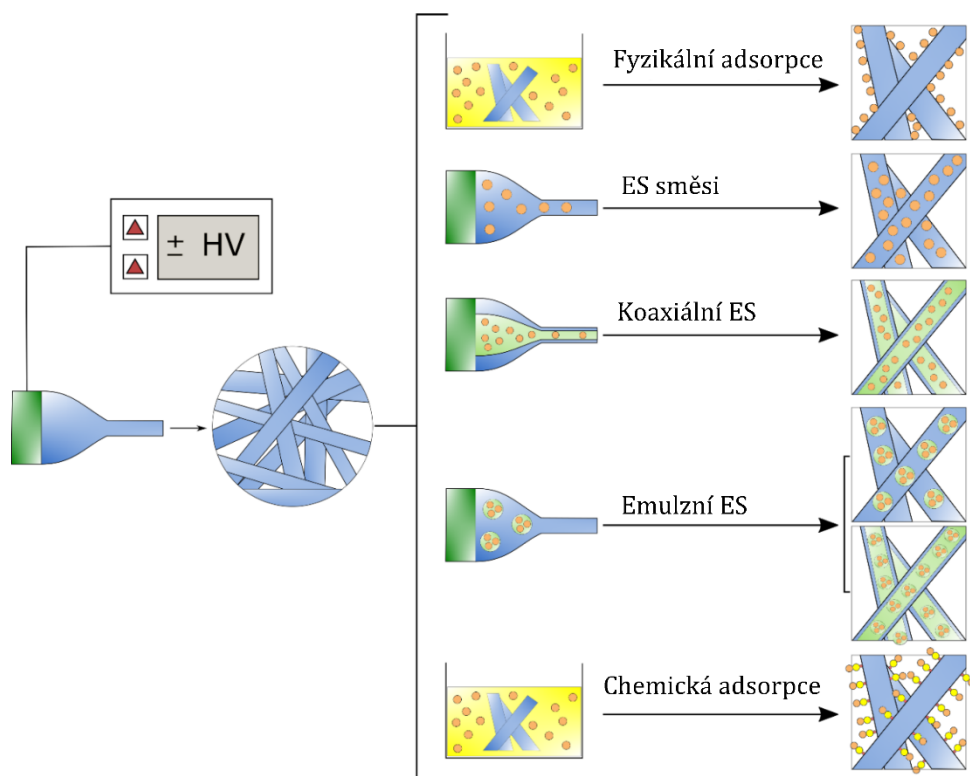
Difúzi lze řídit uvolňování léčiva ze systému. Je založena na principu koncentračního gradientu, kdy rozpuštěná látka samovolně difunduje z oblasti s vyšší koncentrací do oblasti s nižší koncentrací, aby bylo dosaženo rovnováhy v systému. Difúze se uplatňuje hlavně na krátké vzdálenosti, s rostoucí vzdáleností její účinnost klesá. Polymerní matrice, ve které je homogenně dispergována aktivní látka, působí jako zásobní médium i jako prostředník pro difúzi. Důležitou roli zde má geometrie systému, která ovlivňuje uvolňování aktivní látky. Systémy, které obsahují aktivní látku různě vzdálenou od povrchu, často vykazují počáteční „burst“ efekt a poté rychlost uvolňování klesá. V těchto systémech difundují ze začátku všechny molekuly aktivní látky z povrchu matrice do volného prostoru. Aktivní látka, která je hlouběji v matrici musí nejprve difundovat na její povrch, čímž dochází ke zpoždění. Způsobem inkorporace aktivní látky tedy může být určena rychlost a profil uvolňování [42].

#### **4.2. Inkorporace aktivních látek do nanovláknenných struktur**

Léčivo může být za pomoci elektrostatického zvlákňování do nanovláknenných struktur inkorporováno různými způsoby (Obr. 8). Způsob inkorporace má vliv na uložení léčiva v nanovláknenné struktuře, což může ovlivnit výsledný profil uvolňování léčiva [36].

Nejčastější technikou inkorporace léčiva je smíchání léčiva s roztokem polymeru za vzniku pravého roztoku nebo disperze a následné zvlákňování připraveného roztoku. Jedná se o relativně jednoduchý způsob přípravy nanovláknenných vrstev s obsahem léčiva. Fyzikálně chemické vlastnosti polymerů a interakce mezi léčivem a polymerem mohou mít vliv na disperzi léčiva uvnitř nosiče a také na jeho kinetiku uvolňování. Léčivo může být v roztoku dokonale rozpuštěno nebo dispergováno. V ideálním případě, kdy je v roztoku rozpuštěno

léčivo i polymer, je očekávána homogenní inkorporace léčiva v celé nanovláknenné matici. Mělo by tak docházet k zabudování léčiva do vláken, což by mělo zabránit „burst“ efektu a výsledné uvolňování by mělo být pomalejší. Pokud má léčivo a polymer odlišné vlastnosti (je vlákněn disperzní roztok), dochází během procesu ES k migraci léčiva na povrch vlákna, což následně může vést k „burst“ efektu během uvolňování [36; 43; 3].



Obr. 8: Techniky inkorporace aktivních látek do nanovláken [44].

Další možností inkorporace je koaxiální zvlákňování. Jedná se o modifikaci procesu ES, kdy vzniká core-shell struktura vláken. V tomto případě je vlákno tvořeno jádrem (léčivo), které se nachází uvnitř obalu (polymerního vlákna). Jednotlivé roztoky (roztok polymeru a roztok s léčivem) jsou od sebe odděleny ve dvou tryskách. Centrální tryska obsahující léčivo je umístěna uvnitř vnější trysky obsahující roztok polymeru (Obr. 8). Dochází ke zvlákňování ze dvou oddělených roztoků najednou. Před začátkem procesu ES tedy nedochází k interakci léčiva s rozpouštědlem polymerního roztoku. Proto je možné použít i organické rozpouštědlo, aniž by došlo k degradaci nebo ovlivnění biologické aktivity léčiva. Následně v průběhu procesu ES je rozpouštědlo odpařeno [3; 36].

V případě emulzního zvlákňování je v polymerním roztoku určeném pro ES emulgován roztok s léčivem. Výsledný roztok je tvořen vodnou a olejovou fází. Dochází ke zvlákňování

z jednoho roztoku (emulze) na rozdíl od koaxiálního zvlákňování. Výsledkem však může být také core-shell struktura vláken. Léčivo stejně jako v případě koaxiálního zvlákňování nepřichází do kontaktu s rozpouštědlem polymerního roztoku. Regulací vodné a olejové fáze je možné ovlivnit rychlost uvolňování léčiva [36; 43]. V případě core-shell struktury výsledných vláken dochází často k postupnému dlouhotrvajícímu uvolňování, protože léčivo musí difundovat přes jádro i polymerní vlákno [45].

Další možností je adsorpce léčiva na povrch vlákna. Po procesu ES jsou připravená vlákna ponořena do roztoku léčiva a může dojít k navázání molekul léčiva na povrch vlákna pomocí fyzikální nebo chemické adsorpce. Metodu je možné použít pro látky, které nejsou rozpustné v polymerním roztoku. Při fyzikální adsorpci se uplatňují elektrostatické síly, vodíkové vazby, hydrofobní interakce nebo van der Waalsovy síly mezi léčivem a vláknem. Uvolňování léčiva je v tomto případě téměř okamžité, mechanismem uvolňování je desorpce léčiva z povrchu. V případě chemické adsorpce je léčivo navázáno na povrch vlákna pomocí chemické vazby. Povrch vláken je aktivován určitými funkčními skupinami, na které jsou navázány molekuly léčiva. Povrch vláken může být aktivován např. pomocí UV záření, plazmy nebo chemického leptání. V průběhu uvolňování dochází následně ke štěpení vazeb mezi léčivem a vlákny [3; 45].

### **4.3. Faktory ovlivňující uvolňování aktivních látek z nanovláknenných struktur**

Na uvolňování aktivních látek z nanovláknenných struktur má kromě metody inkorporace léčiva vliv také celá řada dalších faktorů uvedených v následujících podkapitolách [45].

#### *4.3.1. Molekulová hmotnost a koncentrace léčiva*

Molekulová hmotnost i koncentrace léčiva může ovlivnit průběh uvolňování léčiva z nanovláken [46]. Ve studiích zabývajících se vlivem molekulové hmotnosti a koncentrace léčiva na uvolňování uvedených v literatuře [47] byl použit jako polymerní nosič polyvinylalkohol (PVA), do jehož roztoku bylo před procesem ES vmícháno léčivo. Bylo prokázáno, že léčiva s větší molekulovou hmotností se uvolňovala pomaleji a také výsledné množství uvolněného léčiva bylo nižší. Tento jev mohl být způsoben snadnější difúzí léčiv s nižší molekulovou hmotností skrz polymerní matici oproti léčivům s vyšší molekulovou hmotností. Vyšší koncentrace použité aktivní látky (meloxikam, kapsaicin) v matici tvořené z PVA vedla k rychlejšímu uvolňování a celkové množství uvolněné látky bylo vyšší. Je možné, že jev mohl být pravděpodobně způsoben snadnější difúzí aktivní látky při vyšší koncentraci přes polymerní matici. Relativní zastoupení polymeru bylo nižší, a proto byla matrice více porézní [47; 48].

Padmakumar et al. (2019) připravili nanovlákná z polymerního roztoku polydioxanonu, do kterého byl vmíchán paklitaxel. S rostoucí koncentrací paklitaxelu docházelo k jeho rychlejšímu uvolňování, což mohlo být způsobeno snadnější difúzí. Kromě difuze však docházelo v tomto případě také k degradaci polymerní matrice, která ovlivnila průběh uvolňování. Při nižších koncentracích nedocházelo k uvolnění veškerého léčiva. Léčivo zůstávalo zachyceno ve vláknech [49].

#### *4.3.2. Rozpustnost léčiva ve vodě a kompatibilita s polymerem*

Rozpustnost léčiva ve vodě ovlivňuje jeho uvolňování ve vodném prostředí. Pokud je rozpustnost vysoká, může docházet k „burst“ efektu při kontaktu léčiva s vodou [48]. Na rychlost uvolňování má vliv také kompatibilita léčiva a polymeru z hlediska hydrofobních vlastností, která ovlivňuje rozložení léčiva v polymerní matrici, jak bylo zmíněno v Kap. 4.2. Zeng et al. (2005) připravili nanovlákná z kyseliny polymléčné (hydrofobní látka), do jejíhož roztoku byla vmíchána dvě různá léčiva, hydrofobní paklitaxel a hydrofilní doxorubicin hydrochlorid. Paklitaxel je s kyselinou polymléčnou z hlediska hydrofobních vlastností kompatibilní, a proto došlo k jeho úspěšné inkorporaci a pozvolnému uvolňování. Doxorubicin hydrochlorid se ovšem nacházel blízko povrchu nanovláken a došlo k „burst“ efektu [50].

#### *4.3.3. Vlastnosti polymeru*

Struktura polymeru a jeho fyzikálně-chemické vlastnosti mají vliv na mechanismus uvolňování léčiva. V závislosti na požadovaných vlastnostech lze zvolit vhodný polymer. Hydrofilní nebo hydrofobní povaha polymeru ovlivňuje jeho degradaci a tím i průběh uvolňování. Hydrofilní polymer ve vodném prostředí rychleji degraduje [48].

Molekulová hmotnost polymeru přispívá k celkovému mechanismu uvolňování. S rostoucí molekulovou hmotností polymeru se zvyšuje botnavost a snižuje se schopnost degradace. Pouze ze znalosti molekulové hmotnosti polymeru ovšem nelze průběh uvolňování předpovědět, protože existuje mnoho dalších faktorů ovlivňujících uvolňování [48].

#### *4.3.4. Další faktory ovlivňující uvolňování*

Mechanismus a profil uvolňování lze upravit přidáním další látky do nanovláknenných vrstev. Jalvandi et al. (2017) připravili nanovlákná z polyvinylalkoholu, do kterého byl přidán čistý levofloxacin a konjugovaný komplex levofloxacin-chitosan vytvořený pomocí amidové vazby. Při použití čistého levofloxacinu došlo k uvolnění 90 % po 8 hodinách. Použití konjugovaného komplexu vedlo k uvolnění pouze 27 % levofloxacinu po 8 hodinách. Během

uvolňování došlo k hydrolýze amidové vazby a poté k difúzi. Amidová vazba je při pH 7,4 velmi stabilní, a proto je rychlost uvolňování nízká. Při nižším pH hydrolýza probíhá rychleji, čímž se také zvyšuje rychlost uvolňování. Průběh uvolňování je v tomto případě možné ovlivnit změnou pH [51].

Teplota okolí má také vliv na mechanismus uvolňování. Wei et al. (2019) připravili pomocí ES nanovláknů z poly(N-isopropylakrylamid-N-methylolakrylamid-akrylamidu) s obsahem aktivní látky kurkuminu. Uvolňování bylo měřeno v roztoku fosfátového pufru (PBS). Během procesu byly střídány teploty 10 a 60 °C. Většina kurkuminu se uvolnila při teplotě 60 °C. Při nižší teplotě byla pravděpodobně potlačena difuze. Teplotou tedy bylo možné řídit množství uvolněného kurkuminu [52].

#### **4.4. Matematické modely uvolňování aktivních látek**

Matematický model představuje rovnici, která popisuje závislost uvolňování léčiva jako funkci času. Díky němu je možné předpovídat kinetiku uvolňování léčiva v daném systému. Pro získání požadovaného profilu uvolňování je nutné znát mechanismy, kterými se uvolňování v daném systému léčiva a nosiče řídí, aby bylo možné kvantitativně předpovídat výslednou kinetiku uvolňování léčiva. Dle těchto mechanismů je pak možné zvolit matematický model, který se dané situaci nejvíce blíží. Naopak i pomocí experimentálních výsledků je možné vybrat vhodný matematický model. Výběr je proveden na základě výpočtu koeficientu determinace pro různé modely. Model, pro který se koeficient nejvíce blíží 1, se nejvíce shoduje s naměřenými daty. Dle tohoto modelu lze odvodit mechanismy, které se uplatňují v daném případě. Existuje mnoho modelů popisujících proces uvolňování. Patří mezi ně model kinetiky nultého řádu, prvního řádu, Higuchiho model, Korsmeyer-Peppas model, Hopfenbergův model nebo Weibullův model. Modely, které se nejlépe přibližují realitě, jsou matematicky složitější a je obtížné najít analytické řešení [42].

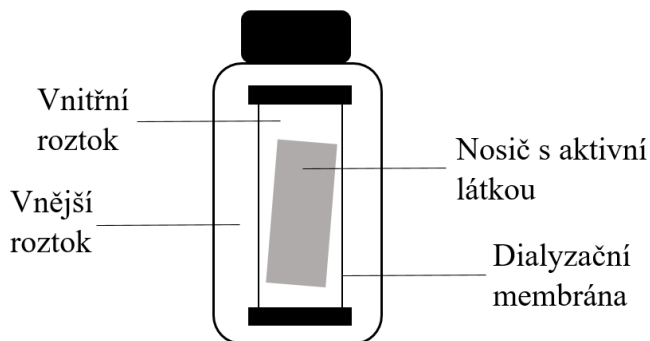
#### **4.5. Metody stanovení kinetiky uvolňování aktivních látek**

Existují různé metody pro stanovení profilu uvolňování aktivní látky z nanovláknenných vrstev *in vitro*. Výběr vhodné metody závisí na druhu aktivní látky a způsobu jejího podání (orální, transdermální, topické). Cílem všech metod je co nejpřesněji simulovat skutečné podmínky *in vivo* v místě podání a působení aktivní látky, aby získaný profil uvolňování co nejvíce odpovídal skutečnému uvolňování v těle člověka. Na základě místa působení aktivní látky je voleno vhodné disoluční médium, teplota nebo pH [53; 54].



Mezi často používané metody pro stanovení kinetiky uvolňování z nanovláknenných vrstev patří disoluční metoda, dialyzační metoda nebo metody využívající průtočná zařízení. Podmínkou disoluční a dialyzační metody je rozpustnost aktivní látky v disolučním médiu. Základní princip disoluční metody spočívá ve vložení nanovláknenné vrstvy s obsahem aktivní látky do disolučního média a sledování uvolněného množství látky v médiu v pravidelných časových intervalech. Médium může být udržováno při konstantní teplotě odpovídající tělesné teplotě (obvykle 37 °C) a bývá v průběhu uvolňování mícháno. Způsob míchání, tvar a velikost disoluční nádoby mají vliv na průběh uvolňování, což je třeba vzít v úvahu [53; 54].

Dialyzační metoda je založená na principu difuze aktivní látky přes dialyzační membránu z vnitřního roztoku obsahujícího nosič s aktivní látkou do vnějšího roztoku (Obr. 9). Aktivní látka se uvolní z nosiče do vnitřního roztoku, který je od okolí utěsněn, a následně difunduje přes dialyzační membránu do vnějšího roztoku. Kinetika uvolňování je určována z obsahu aktivní látky ve vnějším roztoku v pravidelných časových intervalech od začátku měření [55]. Stejně jako u základní disoluční metody může být roztok udržován při konstantní teplotě a bývá během experimentu míchán. Objem vnitřního roztoku obvykle bývá výrazně menší než objem vnějšího roztoku [53].



Obr. 9: Schéma dialyzační metody.

Existují také metody využívající průtočná zařízení, kdy dochází k průtoku média určitou rychlostí přes kolonu obsahující nanovláknennou vrstvu s aktivní látkou. Výsledný eluent je odebírán v pravidelných časových intervalech a je analyzováno množství aktivní látky, které je v něm přítomné [53; 54].

## 5. Praktická část

### 5.1. Chemikálie

K přípravě nanovlákných vrstev byly použity deriváty kyseliny hyaluronové lauroyl hyaluronan (L-HA, Contipro a.s., molekulová hmotnost  $350 \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$ , stupeň substituce 65–80 %) a furanyl hyaluronan (F-HA, Contipro a.s., molekulová hmotnost  $84 \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$ , stupeň substituce 5 %), dále kyselina hyaluronová Hyactive (HA, Contipro a.s., molekulová hmotnost  $96 \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$ ), polyethylenoxid (PEO, Sigma Aldrich, molekulová hmotnost  $400 \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$ ), chlorofenolová červeň (CR, Sigma Aldrich) a izopropylalkohol (IPA, Penta).

K přípravě fosfátového pufru (PBS) byl použit hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát (Lach-ner) a dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát (Lach-ner). Dále byl použit agar (Sigma Aldrich) k přípravě gelu.

### 5.2. Přístroje

K přípravě a charakterizaci nanovlákných vrstev byly použity přístroje 4SPIN LAB, analytické váhy (Mettler Toledo, XSR205, s přesností na 5 desetinných míst), magnetická míchačka (Heidolph, MR Hei-Standard), UV Crosslinker (Fisher Scientific, UVP CL-1000), naprašovačka (Leica, EM ACE600), skenovací elektronový mikroskop (SEM, Zeiss), UV-VIS spektrofotometr (Shimadzu, UV-2401PC), inkubátor (Witeg, WIF-50), orbitální třepačka (IKA, KS 130 basic), digitální tloušťkoměr (Litematic, VL-50-B) a kapalinový chromatograf (Waters, Acquity UPLC H-Class systém) s UV-VIS detekcí (427 nm).

### 5.3. Příprava roztoků

Bylo připraveno 5 roztoků pro elektrostatické zvláknování složených z polymerů v různém poměru (HA, L-HA, F-HA, PEO) a CR. Systém rozpouštědel byl tvořen IPA a destilovanou vodou (DV). Bylo připraveno 40 g každého roztoku. V Tab. 1 je uvedeno označení, složení jednotlivých roztoků a použitý systém rozpouštědel (Rozp.). Hmotnostní koncentrace polymerů v roztoku, tj. teoretický obsah celkové sušiny, je označena  $c_m$ . Vzorky byly značeny ve tvaru V\_x, kde x jsou polymery, ze kterých se daná vrstva skládá (mimo PEO, který obsahuje všechny).

Tab. 1: Složení připravených roztoků.

Označení roztoku	Složení [hm. %]					$c_m$ [hm. %]	Rozp. (poměr v hm. %)
	L-HA	F-HA	HA	PEO	CR		
V_L-HA	90	-	-	5	5	3	DV:IPA (40:60)
V_L-HA/HA	75	-	20	5	5	3	DV:IPA (40:60)
V_F-HA_1	-	90	-	5	5	7	DV
V_L-HA/F-HA	45	45	-	5	5	3	DV:IPA (40:60)
V_F-HA_2	-	85	-	10	5	7	DV

Pro přípravu roztoku V\_L-HA byla nejdříve připravena směs rozpouštědel smícháním 15,52 g DV a 23,28 g IPA. Směs byla umístěna na magnetickou míchačku a za stálého míchání bylo přidáno 0,06 g CR. Po jeho rozpuštění bylo přidáno 0,06 g polymeru PEO. Po částečném rozpuštění PEO bylo do směsi přidáno 1,08 g L-HA. Výsledný roztok byl míchán 12 hodin.

Pro přípravu roztoku V\_L-HA/HA bylo nejdříve v 15,52 g DV rozpuštěno 0,06 g CR. Poté bylo za stálého míchání přidáno 0,24 g HA a 0,06 g PEO, směs byla míchána do rozpuštění. Následně bylo přidáno 23,28 g IPA a po promísání 0,84 g L-HA. Výsledný roztok byl míchán 12 hodin.

Pro přípravu roztoku V\_F-HA\_1, resp. V\_F-HA\_2 bylo v 37,20 g DV rozpuštěno 0,14 g CR. Po rozpuštění bylo za stálého míchání přidáno 0,14 g, resp. 0,28 g PEO a 2,52 g, resp. 2,38 g F-HA. Lahve s roztoky byly obaleny alobalem, aby nebyl F-HA vystavován UV záření. Roztoky byly míchány 12 hodin.

Pro přípravu roztoku V\_L-HA/F-HA bylo v 15,52 g DV rozpuštěno 0,06 g CR. Za stálého míchání bylo přidáno 0,54 g F-HA a 0,06 g PEO. Po jejich rozpuštění bylo přikapáváno 23,28 g IPA a po promísání bylo přidáno 0,54 g L-HA. Láhev byla také obalena alobalem z důvodu přítomnosti F-HA v roztoku. Výsledný roztok byl míchán 12 hodin.

Pro přípravu asi 1,2 l fosfátového pufru (PBS) o koncentraci 0,1 M a pH  $7,39 \pm 0,02$  bylo v 1 l destilované vody za stálého míchání rozpuštěno 35,81 g hydrogenfosforečnanu disodného dodekahydrátu. Dále ve 300 ml destilované vody bylo za stálého míchání rozpuštěno 4,68 g dihydrogenfosforečnanu sodného dihydrátu. Tento roztok byl za stálého míchání a měření pH přikapáván do roztoku hydrogenfosforečnanu disodného dodekahydrátu až do dosažení požadované hodnoty pH výsledného roztoku.

Pro přípravu agaru určeného ke sledování uvolňování CR bylo 15 g agaru smícháno s 500 ml destilované vody. Směs byla ponechána odstát 15 min při pokojové teplotě, aby agar nabobtnal. Poté byl agar zahřát na 90 °C a míchán. Při 90 °C byl agar vařen asi 5 minut, dokud nebyl téměř čirý. Poté byl nechán při pokojové teplotě vychladnout a následně byl vložen do lednice. Před začátkem sledování uvolňování CR byl podélně nařezán na 4 části.

#### 5.4. Elektrostatické zvlákňování

Připravené roztoky byly zvlákňovány na přístroji 4SPIN LAB. Jako emitor byla použita bezjehlová multitryska, kolektorem byl rotační válec (šířka 25 cm, průměr 12 cm). Na kolektor byl přilepen voskový papír jako substrát. Rychlost otáček kolektoru byla nastavena na 100 rpm. Použitý kolektor i emitor je zobrazen na Obr. 10.

a)



b)



Obr. 10: Použitý a) emitor [56], b) kolektor [57].

Všechny připravené roztoky potřebovaly ke správnému vlákňení nižší relativní vlhkost vzduchu, proto před začátkem procesu byla vlhkost uvnitř přístroje snížena foukáním stlačeného vzduchu o průtoku 90 l/min. Počáteční nastavená doba vlákňení 90 min byla upravována dle potřeby. Další parametry zvlákňování byly voleny jednotlivě pro všechny roztoky, aby proces probíhal efektivně, a jsou shrnuty v Tab. 2.

Tab. 2: Parametry elektrostatického zvlákňování roztoků.

Označení vzorku	Vzdálenost kolektoru a emitoru [cm]	Napětí [kV]	Dávkování [ $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ ]	Foukání [ $\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ ]	Teplota [°C]	Relativní vlhkost [%]	Doba [min]
V_L-HA	18	54–58	450	40	27	25–30	78
V_L-HA/HA	18	54–58	450	40	29	25–30	72
V_L-HA/F-HA	18	58	700–800	80	27	25–30	38
V_F-HA_2	14	58	150	80–90	26	7–10	140

U vzorků V\_L-HA a V\_L-HA/HA bylo napětí v průběhu procesu ES zvýšeno z 54 na 58 kV. U vzorku V\_L-HA/F-HA bylo zase během vláknění zvýšeno dávkování roztoku ze 700 na 800  $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$  z důvodu stabilního průběhu ES za těchto podmínek. Relativní vlhkost vzduchu u vzorků V\_L-HA, V\_L-HA/HA a V\_L-HA/F-HA musela být udržována pod 30 % pro optimální průběh procesu. U těchto vzorků se po čase uvedeném v Tab. 2 vyvláknil všechny připravený roztok (40 g). U vzorku V\_F-HA\_2 musela být vlhkost udržována pod 10 % a doba musela být prodloužena z důvodu nižšího dávkování, aby vrstva měla dostatečnou gramáž. Pro roztok V\_F-HA\_1 nebyly nalezeny optimální podmínky zvláknování (z těchto důvodů není vzorek uveden v Tab. 2), a proto byl připraven roztok V\_F-HA\_2 úpravou složení, který obsahoval vyšší podíl vláknotvorného polymeru PEO.

### **5.5. UV cross-linking**

Před dalšími analýzami (stanovení botnavosti, uvolňování CR, skenovací elektronová mikroskopie) byly nanovláknenné vrstvy obsahující F-HA (V\_L-HA/F-HA a V\_F-HA\_2) zesíťovány pomocí UV záření. Při zesíťování dochází ke změně vlastností, F-HA se stává hydrofobním [22]. K zesíťování byl použit UV cross-linker ( $\lambda = 302 \text{ nm}$ ,  $350 \mu\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$ ), do kterého byla vložena část vrstvy bez substrátu určená k další analýze na dobu 60 min.

### **5.6. Metody charakterizace**

#### *5.6.1. Skenovací elektronová mikroskopie*

Všechny připravené nanovláknenné vrstvy byly analyzovány pomocí skenovací elektronové mikroskopie (SEM). Před analýzou byly vrstvy naprašeny v naprašovačce tenkou vrstvou zlata s paladiem, aby byly vodivé pro analýzu SEM. Analýza probíhala při urychlovacím napětí 6,5 kV a byly zaznamenány snímky při zvětšení 500 $\times$ , 1000 $\times$ , 5000 $\times$  a 10 000 $\times$ . U vrstev obsahujících F-HA (V\_L-HA/F-HA a V\_F-HA\_2) byly pořízeny snímky nezesíťovaných i zesíťovaných vrstev. Z pořízených snímků při zvětšení 5000 $\times$  byl v softwaru ImageJ 1.48 stanoven průměr vláken (ze 100 vláken). Pomocí SEM byly také analyzovány vysušené vrstvy po stanovení botnavosti.

#### *5.6.2. Gramáž*

Gramáž nanovláknenných vrstev byla stanovena zvážením 5 částí vrstvy o známých rozměrech ( $2 \times 2$ )  $\text{cm}^2$  a výpočtem průměrné hodnoty pro danou vrstvu. Pomocí gramáže je možné porovnat produktivitu procesu ES [58].

### 5.6.3. *Enkapsulační účinnost*

Enkapsulační účinnost barviva chlorofenolové červeně (CR) v nanovlákněných vrstvách byla stanovena pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) a UV-VIS spektrofotometrie. Pro stanovení pomocí HPCL byla vrstva rozpuštěna v 50 % roztoku IPA na koncentraci  $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ . Po rozpuštění byl 1 ml vzorku napipetován do vialky a bylo k němu přidáno 5  $\mu\text{l}$  enzymu SPHyl (lyáza štěpící  $\beta$ -1,4-glykosidovou vazbu HA, což vede k tvorbě nenasycených disacharidů HA [59]). Vzorek byl promíchán a vložen do inkubátoru na 2 hodiny při  $37^\circ\text{C}$ , poté byl analyzován pomocí HPCL v gradientním režimu. Byla použita kolona Waters Spherisorb C6 ( $150 \text{ mm} \times 4,6 \text{ mm}$ ). Mobilní fáze byly roztoky 0,1 % roztok kyseliny mravenčí ve vodě a acetonitril v různém poměru. Teplota kolony byla  $30^\circ\text{C}$ , teplota autosamploru  $8^\circ\text{C}$ , průtok byl  $0,8 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$  a nástřik vzorku 10  $\mu\text{l}$ . Pro každou vrstvu bylo měření provedeno dvakrát.

Pro měření pomocí UV-VIS spektrofotometru byly od každé vrstvy vystřiženy 3 části o velikosti  $(2 \times 2) \text{ cm}^2$ , které byly zváženy a rozpuštěny ve známém objemu (10 ml) systému rozpouštědel, ve kterém byly připravovány původní roztoky pro danou vrstvu. Vrstvy V\_L-HA, V\_L-HA/HA a V\_L-HA/F-HA byly rozpuštěny v DV:IPA (40:60), vrstva V\_F-HA\_2 pouze v DV. U vzorků obsahujících F-HA byly k analýze použity nezesítované části vrstvy. Pro každý systém rozpouštědel byla naměřena kalibrační řada v rozsahu dle očekávané koncentrace CR v připraveném vzorku. Při měření kalibrační řady bylo měřeno celé spektrum v rozsahu vlnových délek 200–800 nm. U připravených vzorků bylo měřeno spektrum v rozsahu vlnových délek 200–650 nm. Ve spektru bylo nalezeno maximum při určité vlnové délce odpovídající přítomnosti CR (434 nm pro DV a 429 nm pro směs DV:IPA (40:60)). Z této hodnoty absorpance byla určena koncentrace CR ve vrstvách. Koncentrace CR v každé vrstvě byla určena jako průměr tří měření. Z naměřených hodnot byla následně vypočítána enkapsulační účinnost.

### 5.6.4. *Botnavost*

Pro stanovení botnavosti byla sledována změna hmotnosti nanovlákněné vrstvy po vložení do roztoku PBS na určitou dobu. Byla vystřižena část vrstvy o rozměrech  $(2 \times 2) \text{ cm}^2$  a zvážena. Pro zjištění možné závislosti botnavosti na tloušťce byla stanovena tloušťkoměrem tloušťka každé této části vrstvy průměrem ze tří měření. K připravenému vzorku nanovlákněné vrstvy bylo odpipetováno 7 ml PBS a vzorek byl umístěn do inkubátoru při teplotě  $37^\circ\text{C}$ . Botnavost byla měřena po 30 minutách, 1, 4, 8, 24, 48 a 72 hodinách. Po uplynutí daného času byl vzorek

osušen, zvážen a umístěn do inkubátoru až do úplného vyschnutí. Vysušený vzorek byl analyzován pomocí SEM. Bylo sledováno, zda byla po uplynutí daného času zachována nanovláknenná struktura vrstvy. Pro každý čas byly provedeny 3 měření pro každou vrstvu a z nich byla následně určena průměrná botnavost.

#### 5.6.5. *Uvolňování barviva vsádkovou metodou*

Uvolňování chlorofenolové červeně z nanovláknenných vrstev bylo stanoveno vsádkovou metodou s dialyzační membránou. Množství uvolněného barviva v daných časových intervalech bylo analyzováno pomocí UV-VIS spektrofotometrie dle připravené kalibrační řady CR v PBS.

Disoluční médium (PBS) bylo vytemperováno na teplotu 37 °C. Část vrstvy obsahující přibližně 0,9–1,1 mg CR byla vložena do dialyzační membrány spolu s 10 ml PBS. Poté byla membrána vložena do nádoby se 140 ml PBS. Měření probíhalo v inkubátoru za použití orbitální třepačky při teplotě 37 °C a byl udržován konstantní objem. V daném časovém okamžiku (15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 8 h, 24 h, 48 h a 72 h) byly odebrány 3 ml vnějšího roztoku a zároveň byly přidány 3 ml čistého vytemperovaného PBS. Pro každou nanovláknennou vrstvu byla provedena 3 měření. Z nich byla určena průměrná závislost uvolněné frakce barviva na čase.

#### 5.6.6. *Uvolňování barviva do gelu*

Jako gel pro sledování uvolňování CR byl použit agar. Část nanovláknenné vrstvy o rozměrech (2 × 2) cm<sup>2</sup> byla položena na kousek agaru. Agar byl vložen do inkubátoru při teplotě 37 °C. Po uplynutí určité doby (15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 8 h, 24 h, 48 h a 72 h) byl pořízen snímek agaru s uvolněným CR. Byla hodnocena difuze barviva gelem a jeho rozložení.

## 6. Výsledky a diskuze

### 6.1. Elektrostatické zvlákňování

Pomocí metody elektrostatického zvlákňování byly připraveny samonosné nanovláknenné vrstvy složené z derivátů kyseliny hyaluronové a polyethylenoxidu. Jejich přehled včetně složení je uveden v Tab. 1. Do všech nanovláknenných vrstev bylo inkorporováno barvivo chlorofenolová červeň metodou vlákňení z pravého roztoku (blend). To znamená, že dané polymery a současně i barvivo byly rozpuštěny v jednotném rozpouštědlovém systému (destilovaná voda a izopropylalkohol, resp. destilovaná voda). Kolektorem byl rotační válec, který byl pokryt voskovým papírem. Jako emitor byla použita statická bezjehlová multitryska. Díky zvolené kombinaci emitor-kolektor bylo dosaženo výborné efektivity procesu ES, protože multitryska má vyšší produktivitu oproti samotné jehle. Multitryska vyžaduje použití vyššího napětí oproti jehle (Kap. 2.3.) [3], a proto bylo nutné aplikovat napětí v rozmezí 54–58 kV.

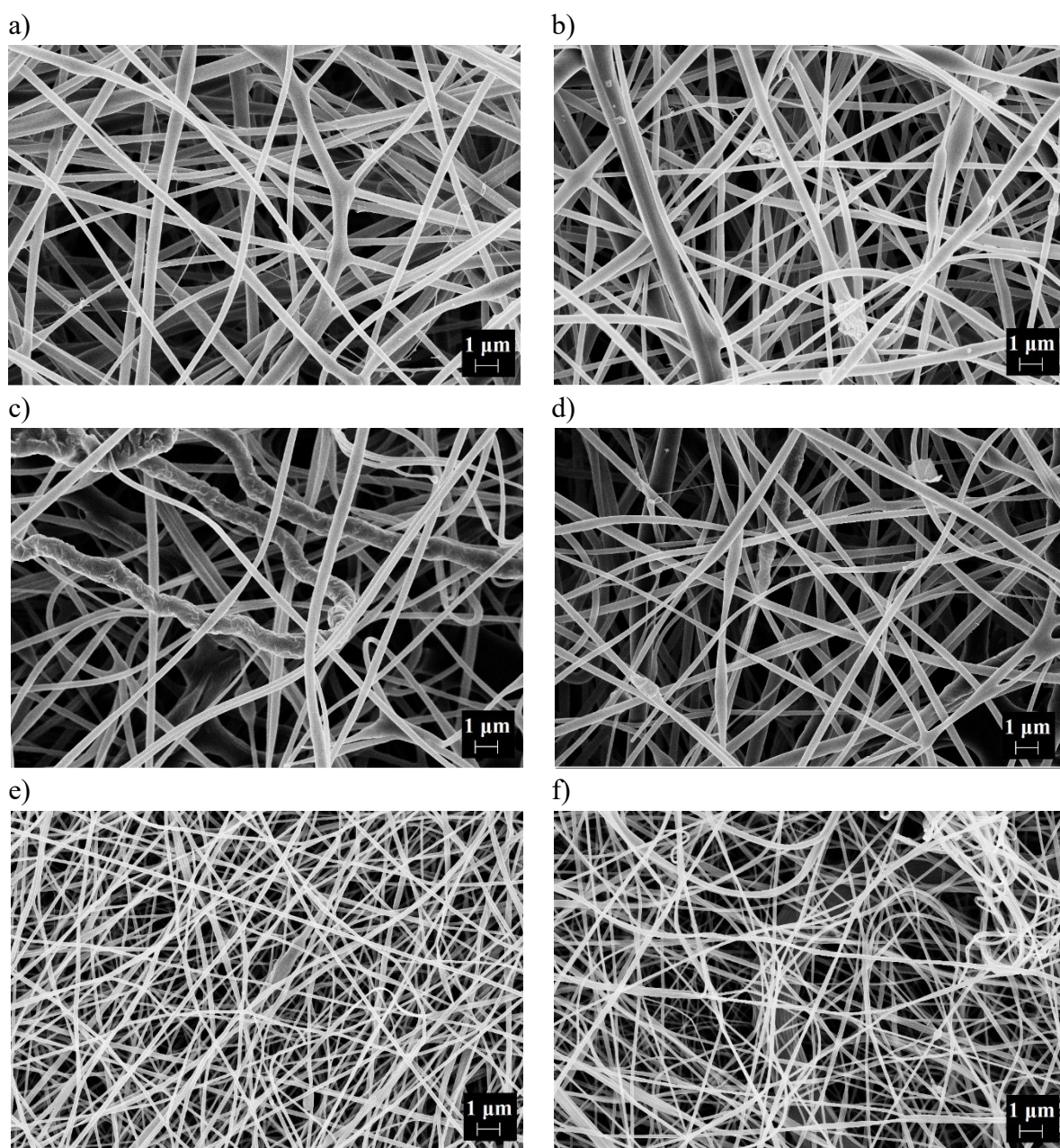
Pro každý připravený roztok byly hledány optimální parametry procesu ES, aby proces probíhal stabilně a vznikla homogenní nanovláknenná vrstva. Všechny parametry jsou uvedeny v Tab. 2. I přes zvolené parametry u roztoků V\_L-HA a V\_L-HA/HA během vlákňení docházelo k zasychání roztoku na emitoru a k ucpávání některých trysek. Proto bylo nutné proces ES v průběhu přerušovat, aby nedocházelo k hromadění zaschlého roztoku. Roztok V\_L-HA/F-HA zasychal v průběhu vlákňení méně a bylo nutné u něj nastavit vyšší dávkování než u předchozích dvou roztoků, aby vlákňení probíhalo kontinuálně. Pro roztok V\_F-HA\_1 nebyly nalezeny vhodné parametry procesu ES, roztok se nepodařilo úspěšně zvláknit. Proto byl připraven roztok V\_F-HA\_2 úpravou složení, který obsahoval větší hmotnostní podíl polyethylenoxidu (PEO), který ve směsi sloužil jako vláknotvorný polymer. Tento roztok se již podařilo zvláknit. Bylo ovšem nutné zvýšit intenzitu elektrického pole zmenšením vzdálenosti kolektoru a emitoru při stejném napětí a snížit dávkování, aby nedocházelo k přetékání nezvlákněného roztoku.

Jak bylo zmíněno v Kap. 2.4.3., důležitým parametrem procesu ES je okolní vlhkost. V případě vlákňení derivátů HA bylo nutné udržovat nízkou vlhkost, čehož bylo dosaženo použitím mrazem sušeného stlačeného vzduchu, který byl přiveden do klimatické komory přístroje 4SPIN LAB. V případě vyšší vlhkosti by nebylo možné roztok zvláknit (F-HA), nebo by docházelo k tvorbě defektů na vrstvě (L-HA, L-HA/F-HA). Nejcitlivější na vlhkost byl roztok V\_F-HA\_2 pravděpodobně z důvodu použitého rozpouštědla, kterým byla pouze DV. Vlhkost bylo nutné v tomto případě udržovat pod 10 %.



## 6.2. Skenovací elektronová mikroskopie

Všechny připravené nanovláknenné vrstvy (V\_L-HA, V\_L-HA/HA, V\_L-HA/F-HA a V\_F-HA\_2) byly charakterizovány pomocí skenovací elektronové mikroskopie (SEM). Vrstvy V\_L-HA/F-HA a V\_F-HA\_2 byly analyzovány před i po jejich zesítnění UV zářením. Byly pořízeny snímky se zvětšením 500 $\times$ , 1000 $\times$ , 5000 $\times$  a 10 000 $\times$ . Všechny snímky jsou uvedeny v příloze 1. Pro větší přehlednost jsou na tomto místě zobrazeny pouze snímky vrstev při zvětšení 5000 $\times$  (Obr. 11).



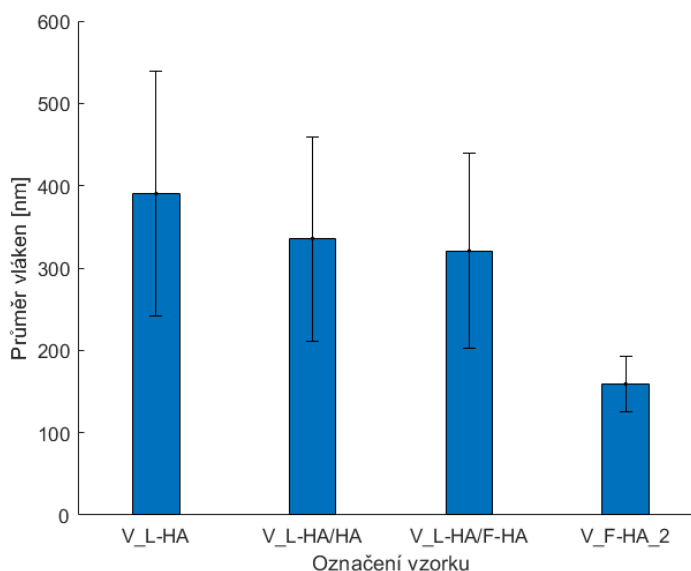
Obr. 11: SEM snímky při zvětšení 5000 $\times$  a) V\_L-HA, b) V\_L-HA/HA, c) V\_L-HA/F-HA před zesítněním, d) V\_L-HA/F-HA po zesítněním, e) V\_F-HA\_2 před zesítněním, f) V\_F-HA\_2 po zesítněním.

V případě všech připravených nanovláknenných vrstev byla vlákna orientována náhodně, nedocházelo k jejich uspořádání určitým směrem. Náhodná orientace vláken pravděpodobně souvisela s nízkými otáčkami kolektoru (100 rpm) [60; 3]. Vlákna vrstev V\_L-HA a V\_L-HA/HA byla vesměs hladká, bez přítomnosti výrazných defektů. Vrstva V\_L-HA/F-HA obsahovala také vlákna s drsnější texturou (docházelo k tvorbě defektů). Po zesílení této vrstvy nedošlo k výrazným změnám morfologie vláken. Vrstva V\_F-HA\_2 byla tvořena hladkými vlákny. Dle SEM snímků je zřejmé, že vlákna této vrstvy byla jednoznačně nejtenčí. Zesílení UV zářením také v tomto případě nezpůsobilo významný rozdíl v morfologii vláken.

Ze SEM snímků byl určen průměr vláken všech vrstev a výběrová směrodatná odchylka  $s$ . Všechny směrodatné odchylky uvedené v této práci byly vypočteny dle vztahu:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{(n - 1)}} \quad (2)$$

kde  $X$  je měřená veličina,  $\bar{X}$  aritmetický průměr všech měření a  $n$  počet měření. Průměr vláken jednotlivých vrstev se směrodatnou odchylkou je znázorněn na Obr. 12. Vlákna vrstvy V\_L-HA měla největší průměr, a to  $390 \pm 149$  nm. Přidání HA, či kombinace L-HA a F-HA průměr vláken výrazně neovlivnila (v rámci odchylek), průměr vláken vrstvy V\_L-HA/HA byl  $336 \pm 124$  nm a V\_L-HA/F-HA  $321 \pm 118$  nm. Velikostně se výrazněji odlišovala vlákna V\_F-HA\_2 ( $159 \pm 34$  nm), která byla nejtenčí.



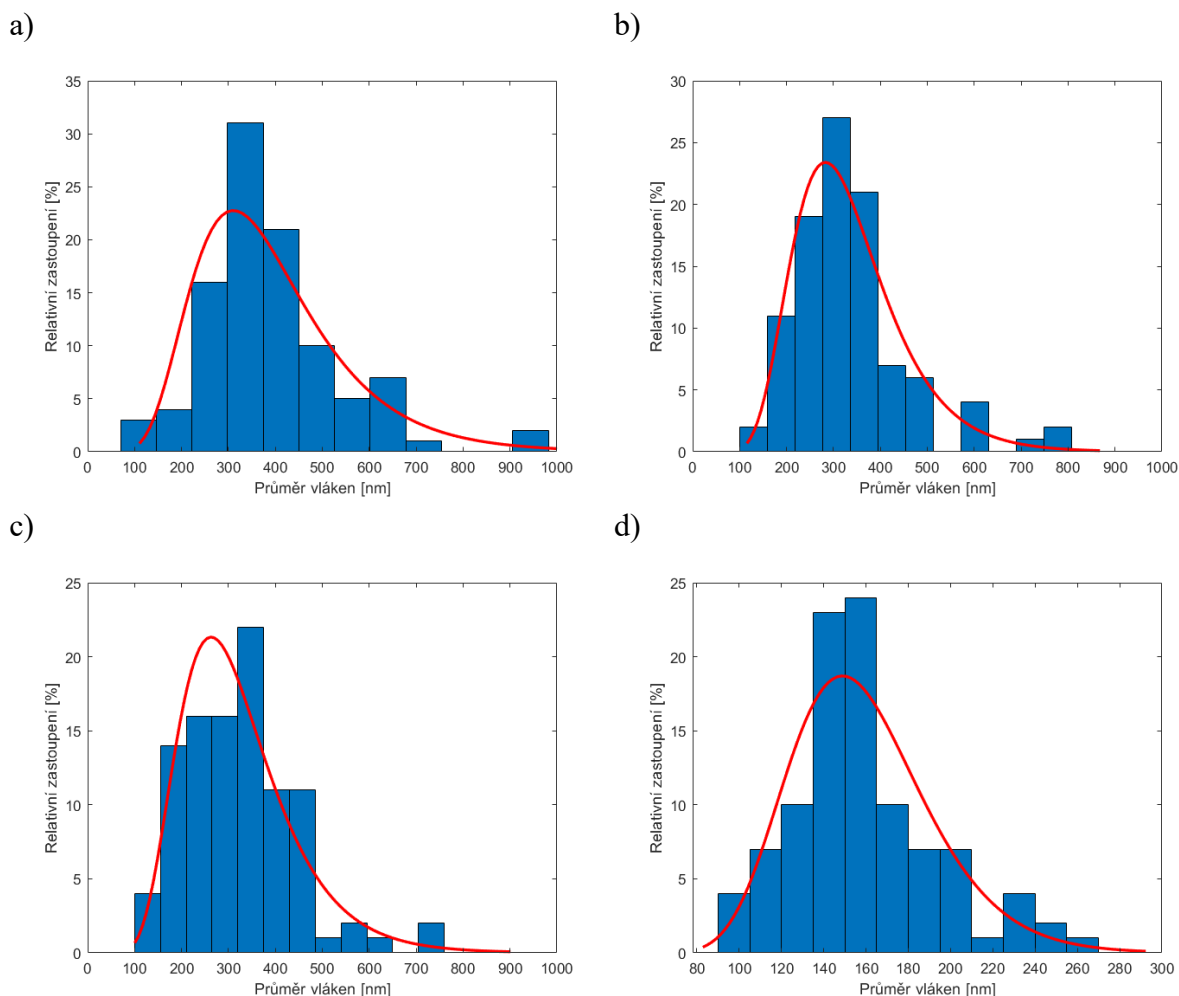
Obr. 12: Průměr vláken nanovláknenných vrstev se směrodatnou odchylkou.

Na Obr. 13 je znázorněna distribuce průměrů vláken jednotlivých nanovláknenných vrstev, která byla proložena funkcí hustoty pravděpodobnosti lognormálního rozdělení ve tvaru:

$$f(d) = \frac{1}{d\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{1}{2}\left(\frac{\ln d - \mu}{\sigma}\right)^2} \quad (3)$$

kde  $d$  [m] je průměr vlákna,  $\mu$  [m] je střední hodnota,  $\sigma$  [m] je směrodatná odchylka a  $\sigma^2$  [m<sup>2</sup>] je rozptyl [61].

Lognormální rozdělení poměrně dobře charakterizovalo rozložení velikostí průměrů vláken všech vrstev. Z grafů distribuce průměrů vyplývá, že nejvíce vláken vrstev V\_L-HA, V\_L-HA/HA a V\_L-HA/F-HA mělo průměr 300–400 nm a bylo zde minimální zastoupení vláken větších než 600 nm. Tyto vrstvy měly podobnou distribuci průměrů vláken. Vrstva V\_F-HA\_2 měla distribuci vláken nejúžší, čemuž současně odpovídala i nejnižší směrodatná odchylka. Velikost vláken se pohybovala v rozmezí od 90 do 260 nm, přičemž nejvíce vláken mělo velikost 140 až 160 nm.



Obr. 13: Distribuce průměru vláken s proloženou funkcí hustoty pravděpodobnosti lognormálního rozdělení a) V\_L-HA, b) V\_L-HA/HA, c) V\_L-HA/F-HA, d) V\_F-HA\_2.

### 6.3. Gramáž

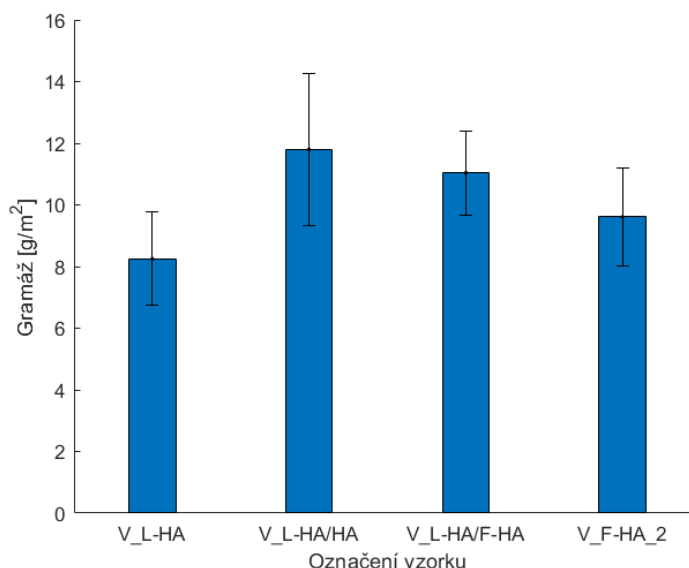
Bylo zváženo 5 částí každé připravené nanovlákněné vrstvy o velikosti  $(2 \times 2) \text{ cm}^2$ . Podílem hmotnosti  $m$  [g] a plochy  $S$  [ $\text{m}^2$ ] každé části vrstvy byla stanovena gramáž  $G$  [ $\text{g} \cdot \text{m}^{-2}$ ]:

$$G = \frac{m}{S} \quad (4)$$

Následně byla určena průměrná hodnota gramáže  $\bar{G}$  pro každou vrstvu a výběrová směrodatná odchylka  $s_g$  [ $\text{g} \cdot \text{m}^{-2}$ ]. Výsledky jsou shrnuty v Tab. 3 a Obr. 14. U všech vrstev bylo dosaženo dostatečné gramáže, a proto byly připravené vrstvy samonosné a bylo možné s nimi snadno manipulovat. Gramáž jednotlivých vrstev souvisí s produktivitou procesu ES, která hraje významnou roli v průmyslové výrobě [58]. Jednotlivé vrstvy byly ovšem vlákněny různou dobu při odlišném dávkování roztoku, hodnoty proto nebylo možné přímo porovnat.

Tab. 3: Výsledné hodnoty gramáže včetně směrodatné odchylky.

Vrstva	$\bar{G}$ [ $\text{g} \cdot \text{m}^{-2}$ ]	$s_g$ [ $\text{g} \cdot \text{m}^{-2}$ ]
V_L-HA	8,25	1,51
V_L-HA/HA	11,80	2,45
V_L-HA/F-HA	11,04	1,37
V_F-HA_2	9,61	1,59



Obr. 14: Gramáž nanovlákněných vrstev se směrodatnou odchylkou.

#### 6.4. Enkapsulační účinnost

Enkapsulační účinnost byla určena pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) a UV-VIS spektrofotometrie a výsledky byly porovnány.

Pro stanovení pomocí UV-VIS spektrofotometrie byly nejprve vytvořeny kalibrační křivky závislosti absorbance na hmotnostní koncentraci chlorofenolové červeně (CR) v systému rozpouštědel DV:IPA (40:60) a v DV dle maximální hodnoty absorbance pro CR (429 nm pro systém DV:IPA a 434 nm pro DV). Kalibrační křivky jsou uvedeny v příloze 2. Bylo provedeno také kontrolní měření odpovídajících nanovláknových vrstev stejného složení bez barviva rozpuštěných v daném rozpouštědle. Bylo potvrzeno, že při vlnových délkách (429 nm resp. 434 nm) neabsorbují záření a absorbance je tedy charakteristická pouze pro CR. Následně byly všechny vrstvy rozpuštěny v daném rozpouštědle (pro každou z nich byla provedena 3 měření) a byla určena hmotnostní koncentrace barviva  $c_m$  [g·ml<sup>-1</sup>] ve vrstvě na základě kalibrační křivky.

Ze známé hmotnostní koncentrace CR ve vrstvě  $c_m$ , známého objemu rozpouštědla  $V_{rozp}$  [ml] (ve všech případech 10 ml) a známé hmotnosti vzorku  $m_{vz}$  [g] byl určen hmotnostní zlomek CR ve vrstvě  $w_{CRvz}$  [-] (kolik barviva vrstva reálně obsahuje) dle vztahu:

$$w_{CRvz} = \frac{c_m V_{rozp}}{m_{vz}} \quad (5)$$

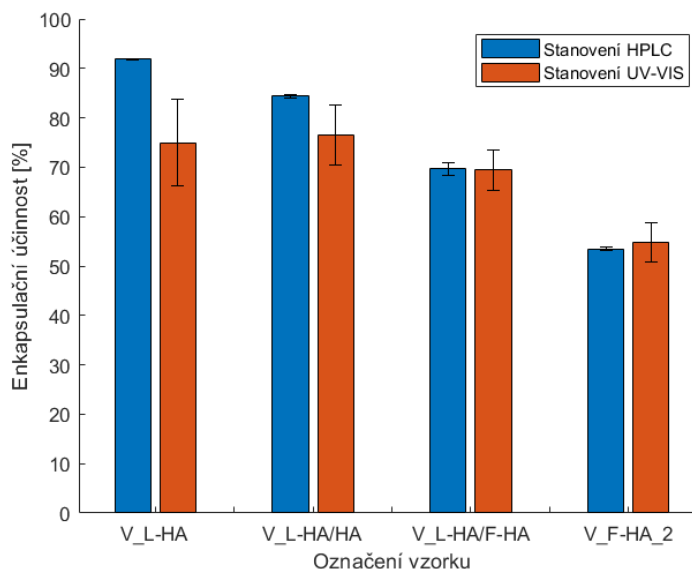
Tento reálný hmotnostní zlomek CR ve vrstvě byl určen také pomocí 2 měření metodou HPLC. Z průměrné hodnoty reálného hmotnostního zlomku CR ve vrstvě a předpokládaného hmotnostního zastoupení CR  $w_{CR}$  [-] (pro všechny vrstvy 5 %) byla stanovena enkapsulační účinnost CR v nanovláknových vrstvách  $\eta$  [-] dle vztahu:

$$\eta = \frac{w_{CRvz}}{w_{CR}} \quad (6)$$

Byla také stanovena směrodatná odchylka enkapsulační účinnosti  $s_\eta$  [-]. Výsledné hodnoty získané prostřednictvím obou metod jsou shrnuty v Tab. 4 a Obr. 15.

Tab. 4: Výsledné hodnoty enkapsulační účinnosti včetně směrodatné odchylky.

Vrstva	UV-VIS spektrofotometrie			HPLC		
	$\overline{w_{CRvz}} [\%]$	$\overline{\eta} [\%]$	$s_\eta [\%]$	$\overline{w_{CRvz}} [\%]$	$\overline{\eta} [\%]$	$s_\eta [\%]$
V_L-HA	3,75	74,97	8,70	4,59	91,83	0,16
V_L-HA/HA	3,83	76,53	5,98	4,22	84,41	0,39
V_L-HA/F-HA	3,47	69,43	4,03	3,48	69,67	1,35
V_F-HA_2	2,74	54,85	4,02	2,67	53,48	0,34



Obr. 15: Enkapsulační účinnost barviva stanovená metodami HPLC a UV-VIS spektrofotometrie.

Výsledné hodnoty enkapsulační účinnosti stanovené pomocí obou metod vykazovaly stejný trend pro všechny vrstvy. Při srovnání obou metod se jednotlivé výsledné hodnoty enkapsulační účinnosti mírně odlišovaly u vrstev V\_L-HA a V\_L-HA/HA. Pro vrstvy V\_L-HA/F-HA a V\_F-HA\_2 byla naopak shoda obou metod nejvyšší. Stanovení metodou HPLC bylo dle zjištěné směrodatné odchylky přesnější než metodou UV-VIS spektrofotometrie, proto pro výpočet uvolňování byly použity hodnoty získané metodou HPLC. Odchylky jednotlivých měření mohly být způsobeny (mimo použitou charakterizační metodu) také nerovnoměrným rozložením barviva v nanovláknenné vrstvě, k čemuž mohlo dojít během procesu ES.

Z výsledků měření dle metody HPLC vyplývá, že vrstva V\_L-HA měla nejvyšší hodnotu enkapsulační účinnosti. Do nanovláknenné vrstvy se pomocí procesu ES podařilo převést největší množství vloženého barviva, proces ES proto z tohoto hlediska probíhal nejefektivněji. Naopak nejmenší enkapsulační účinnost měla vrstva V\_F-HA\_2, proces ES nebyl v tomto případě příliš efektivní. Enkapsulační účinnost vrstvy V\_L-HA/F-HA byla mezi hodnotami vrstev V\_L-HA a V\_F-HA\_2, což odpovídalo jejímu složení z kombinace těchto derivátů.

Uvedené výsledky se týkají jen použitého barviva chlorofenolové červeně. Enkapsulační účinnost jiných látek, které mají odlišné vlastnosti, se může při použití stejných polymerů značně lišit.



## 6.5. Botnavost

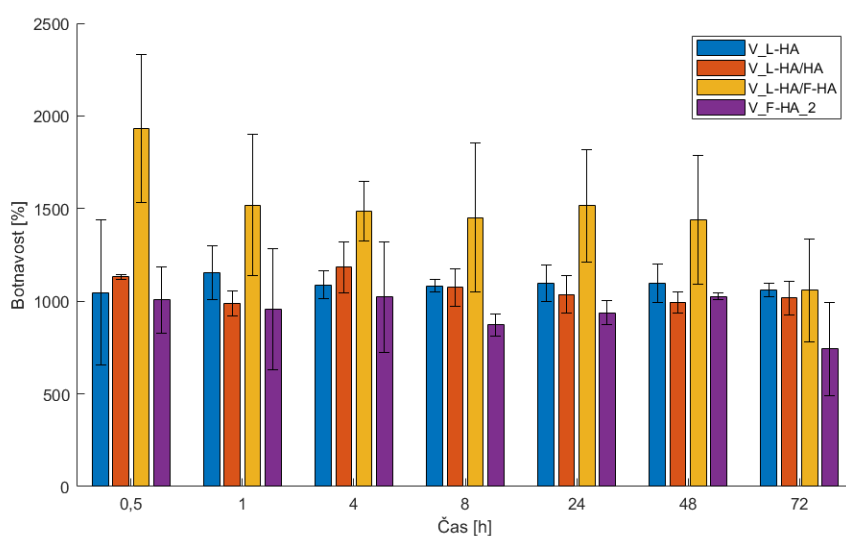
Botnavost v roztoku fosfátového pufru (PBS) byla stanovena pro všechny připravené nanovlákněné vrstvy V\_L-HA, V\_L-HA/HA, V\_L-HA/F-HA a V\_F-HA\_2 v intervalech 30 minut, 1, 4, 8, 24, 48 a 72 hodin vložení definované části vrstvy do 7 ml PBS při 37 °C. Botnavost  $b$  [-] byla vypočtena z hmotnosti vzorku před vložení do pufru  $m_0$  [g] a hmotnosti vzorku v daném čase  $m_t$  [g] dle vztahu:

$$b = \frac{m_t - m_0}{m_0} \quad (7)$$

Pro každou vrstvu a každý čas byla provedena 3 měření, ze kterých byla stanovena průměrná botnavost  $\bar{b}$  a směrodatná odchylka  $s_b$  [-]. V Tab. 5 a Obr. 16 jsou shrnuty průměrné hodnoty botnavosti a směrodatné odchylky pro jednotlivé vrstvy.

Tab. 5: Průměrné hodnoty botnavosti včetně směrodatné odchylky.

	V_L-HA		V_L-HA/HA		V_L-HA/F-HA		V_F-HA_2	
	$\bar{b}$ [%]	$s_b$ [%]	$\bar{b}$ [%]	$s_b$ [%]	$\bar{b}$ [%]	$s_b$ [%]	$\bar{b}$ [%]	$s_b$ [%]
30 min	1047	393	1131	14	1930	399	1008	179
1 h	1152	145	989	69	1519	382	957	328
4 h	1088	75	1185	138	1485	162	1023	299
8 h	1083	33	1075	101	1452	400	873	60
24 h	1097	98	1037	100	1516	305	938	63
48 h	1096	103	995	58	1440	348	1027	20
72 h	1061	34	1017	90	1059	276	742	250



Obr. 16: Botnavost nanovlákněných vrstev se směrodatnou odchylkou.

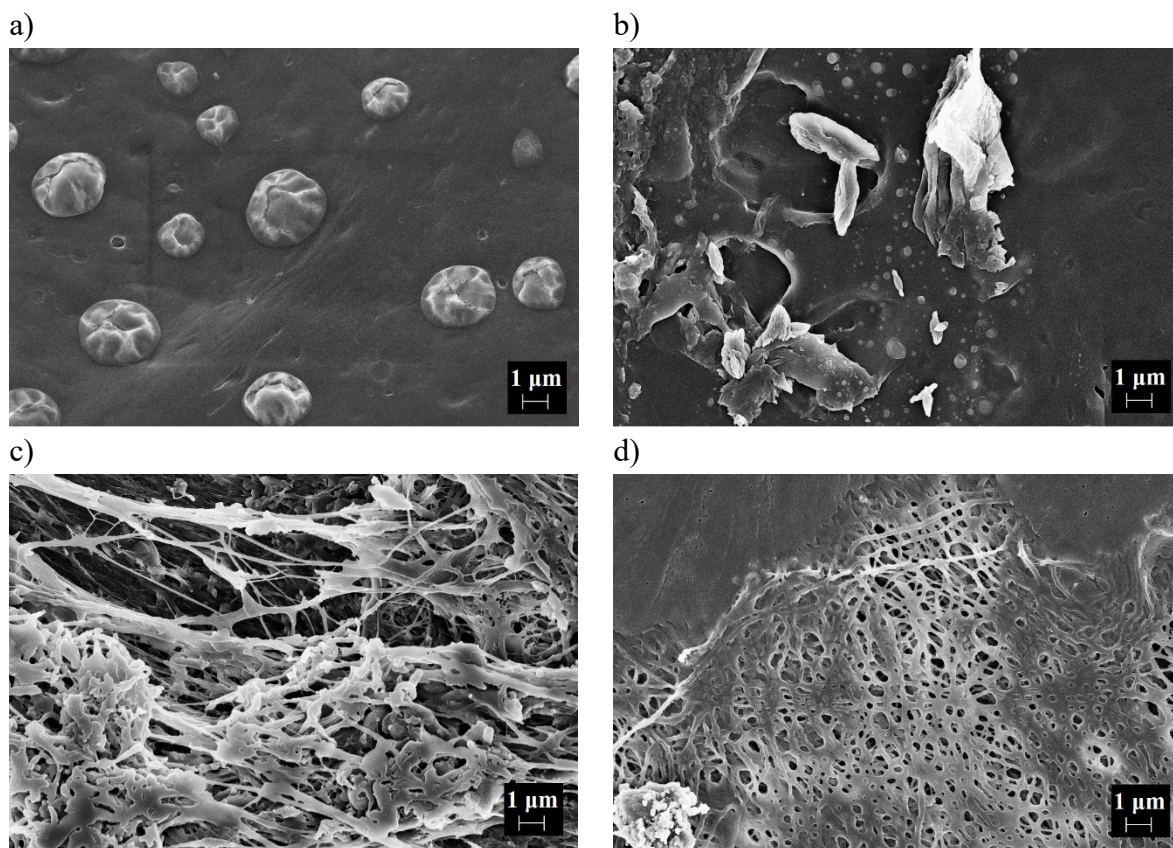
Hodnoty botnavosti byly v případě všech vrstev podobné po celou dobu měření, přičemž k výraznému nárůstu hmotnosti došlo již po 30 minutách, po delší době se hodnoty botnavosti výrazně nelišily. To znamená, že vrstvy dosáhly své maximální absorpční kapacity již po této době. Vrstvy V\_L-HA a V\_L-HA/HA vykazovaly podobné hodnoty botnavosti, přídavek hydrofilní HA tak neměl na hodnotu botnavosti nanovlákněné vrstvy zásadní vliv. Nejnížší botnavost měla vrstva V\_F-HA\_2, která se však příliš neodlišovala od vrstev V\_L-HA a V\_L-HA/HA. Nejvyšší hodnoty botnavosti a směrodatné odchylky vykazovala vrstva V\_L-HA/F-HA, která obsahovala kombinaci dvou derivátů kyseliny hyaluronové.

Nanovlákněné vrstvy V\_L-HA a V\_L-HA/HA byly po vytažení z roztoku PBS ve všech případech pevné, netrhaly se, zachovaly si své mechanické vlastnosti i po 72 hodinách. Díky tomu byla jejich botnavost stanovena přesněji než u ostatních vrstev, čemuž odpovídaly i nižší hodnoty směrodatných odchylek. Vrstvy V\_L-HA/F-HA a V\_F-HA\_2 už po jedné hodině v roztoku PBS ztratily své původní mechanické vlastnosti. Docházelo k jejich trhání, a proto i jejich vážení bylo méně přesné. Po delší době tyto vrstvy zgelovatěly, přičemž vrstva V\_L-HA/F-HA měla dle subjektivního hodnocení tyto vlastnosti výraznější než vrstva V\_F-HA\_2. Zhoršené mechanické vlastnosti pravděpodobně souvisely s přítomností derivátu F-HA.

Nanovlákněné vrstvy byly po stanovení botnavosti umístěny do inkubátoru do úplného vyschnutí. Následně byl pořízen SEM snímek pro všechny vrstvy v jednotlivých časech, aby bylo zjištěno, zda byla zachována jejich nanovlákněná struktura. Všechny SEM snímky při zvětšení 5000× jsou uvedeny v příloze 3. Pro lepší přehlednost jsou na Obr. 17 SEM snímky všech vrstev pouze po 72 hodinách.

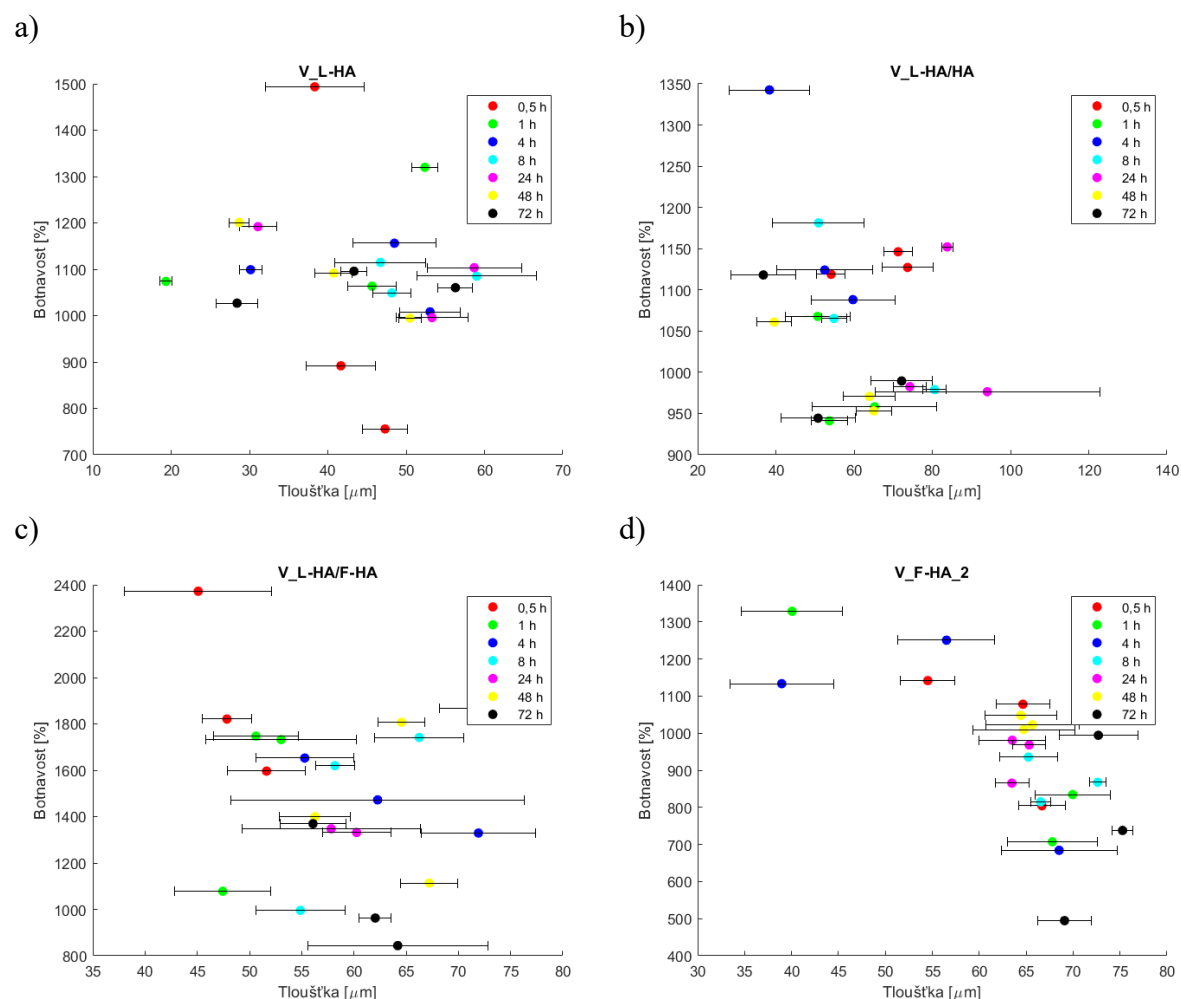
Vrstvy V\_L-HA a V\_L-HA/HA si dle SEM snímků nanovlákněnou strukturu nezachovaly, došlo k vytvoření filmu s náhodně rozmístěnými póry či zbytky vlákněné struktury. U vrstev obsahujících derivát F-HA (V\_L-HA/F-HA a V\_F-HA\_2) zůstala nanovlákněná struktura zachována i po 72 hodinách. Podobu vrstev na SEM snímcích ovšem ovlivňovalo vysychání vzorku, během něhož mohlo dojít např. k překrytí nanovlákněné struktury vrstvou PEO nebo krystaly solí z PBS, díky čemuž nemusela být na všech snímcích nanovlákněná struktura patrná.





Obr. 17: SEM snímky po 72 h v roztoku PBS při zvětšení 5000× a) V\_L-HA, b) V\_L-HA/HA, c) V\_L-HA/F-HA, d) V\_F-HA\_2.

Před měřením botnavosti byla také měřena tloušťka všech vrstev pro zjištění, zda byla botnavost závislá na tloušťce vrstvy. Tloušťka každého vzorku byla určena průměrem 3 měření. Na Obr. 18 jsou znázorněny výsledné grafy závislosti botnavosti na tloušťce včetně směrodatné odchylky tloušťky jednotlivých vzorků. Botnavost každého vzorku byla měřena jedenkrát po daném čase v roztoku PBS. V grafech byly rozlišeny botnavosti pro jednotlivé časy. Ve výsledných grafech nebylo možné nalézt obecnou závislost botnavosti na tloušťce daných vrstev.



Obr. 18: Závislosti botnavosti na tloušťce nanovláknenných vrstev v jednotlivých časových intervalech a) V\_L-HA, b) V\_L-HA/HA, c) V\_L-HA/F-HA, d) V\_F-HA\_2.

## 6.6. Uvolňování barviva vsádkovou metodou

Uvolňování barviva chlorofenolové červeně bylo zkoumáno *in vitro* vsádkovou metodou s dialyzační membránou do roztoku fosfátového pufru (PBS) s kumulativními odběry. Hmotnostní koncentrace barviva byla určena na základě kalibrační křivky CR v PBS, která je uvedena v příloze 2. Hodnota maximální absorbance pro CR bylo v tomto případě 574 nm. Hmotnost uvolněného barviva ve vnějším roztoku v jednotlivých časech byla určena ze známé hmotnostní koncentrace a objemu vnějšího roztoku (140 ml), přičemž byl proveden přepočet z důvodu odebírání roztoku pro analýzy a přidávání čistého PBS v průběhu měření. Uvolněná frakce barviva  $f[-]$  v jednotlivých časech byla určena jako poměr hmotnosti barviva uvolněného do vnějšího roztoku  $M_{out}$  [g] a počáteční hmotnosti barviva ve vložené vrstvě  $M_0$  [g]:

$$f = \frac{M_{out}}{M_0} \quad (8)$$

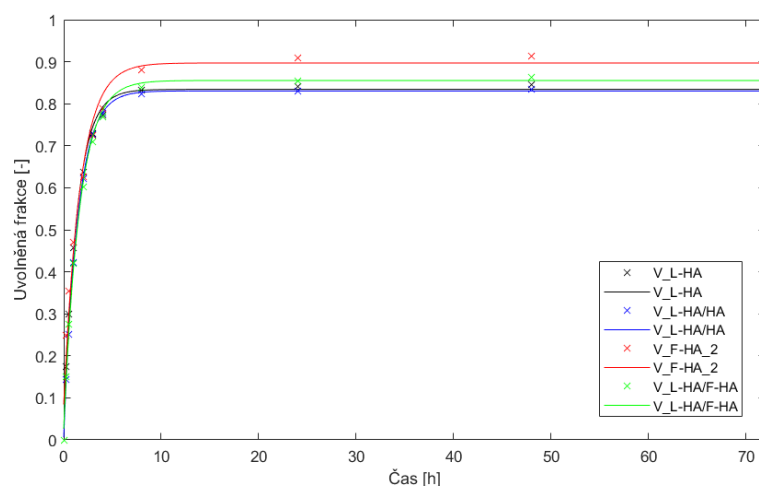
Počáteční hmotnost CR ve vložené vrstvě  $M_0$  byla určena z hmotnosti této vrstvy a hmotnostního zastoupení CR ve vrstvě získaného metodou HPLC (Kap. 6.4.). Hodnota  $M_0$  byla v případě všech vrstev volena v intervalu 0,9–1,1 g, aby nedocházelo k ovlivňování uvolňování na základě odlišné počáteční hmotnosti barviva. Pro názornost jsou v Tab. 6 uvedeny naměřené hodnoty pro stanovení průměrné hodnoty uvolněné frakce pro vrstvu V\_F-HA.

Tab. 6: Naměřené hodnoty pro stanovení průměrné uvolněné frakce vrstvy V\_F-HA.

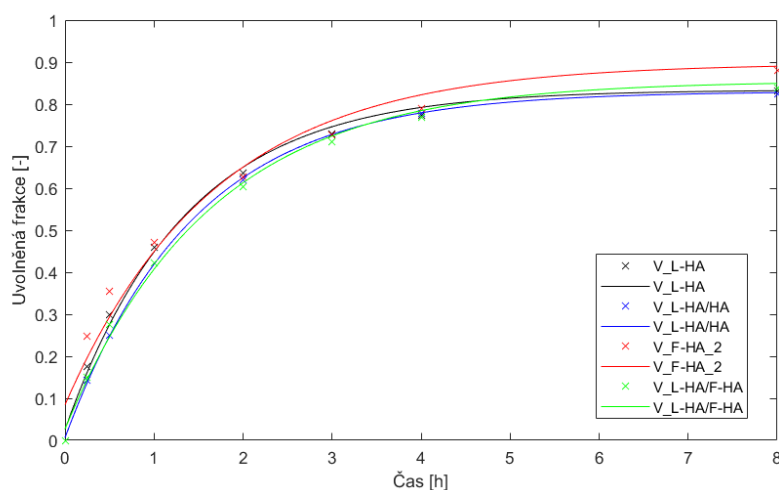
	1. měření		2. měření		3. měření		Průměrná frakce
$M_0$ [g]	1,099		1,025		0,990		
	$M_{out}$ [g]	$f$ [-]	$M_{out}$ [g]	$f$ [-]	$M_{out}$ [g]	$f$ [-]	$\bar{f}$ [-]
15 min	0,234	0,213	0,154	0,150	0,087	0,088	0,150
30 min	0,370	0,337	0,291	0,284	0,204	0,206	0,276
1 h	0,511	0,465	0,436	0,426	0,368	0,372	0,421
2 h	0,683	0,622	0,613	0,599	0,582	0,587	0,602
3 h	0,782	0,712	0,731	0,713	0,696	0,703	0,709
4 h	0,836	0,761	0,797	0,778	0,757	0,764	0,768
8 h	0,907	0,825	0,877	0,856	0,826	0,834	0,838
24 h	0,918	0,836	0,908	0,886	0,834	0,842	0,855
48 h	0,914	0,832	0,934	0,912	0,838	0,846	0,863
72 h	0,922	0,839	0,968	0,944	0,845	0,853	0,879

Na Obr. 19 je znázorněno uvolňování barviva z jednotlivých vrstev (závislost uvolněné frakce barviva na čase) průměrem ze tří měření po dobu 72 h, pro lepší názornost je také znázorněno uvolňování v průběhu prvních 8 hodin. Z důvodu přehlednosti nejsou v grafech zaneseny směrodatné odchylky. Grafy závislosti uvolněné frakce na čase pro jednotlivá měření jsou uvedeny v příloze 4. Z naměřených hodnot vyplývá, že závislost uvolňování barviva na čase při opakovaném měření jednotlivých vrstev byla téměř shodná, tzn. výsledky uvolňování barviva vsádkovou metodou byly dobře reprodukovatelné.

a)



b)



Obr. 19: Uvolňování barviva z jednotlivých vrstev v závislosti na čase a) 0 až 72 h, b) 0 až 8 h.

Naměřené hodnoty byly proloženy Weibullovou funkcí ve tvaru:

$$f = 1 - e^{-at^b} \quad (9)$$

kde  $f[-]$  je uvolněná frakce,  $t [h]$  je čas,  $a$  je parametr měřítka a  $b$  je parametr tvaru funkce [55]. Z naměřených hodnot vyplývá, že po delším čase (více než 24 h) se již hodnota uvolněné frakce barviva neměnila. Lze proto předpokládat, že došlo k vyrovnání koncentrací roztoků uvnitř a vně membrány a nedocházelo k dalšímu výraznému uvolňování barviva z vrstvy. K výslednému uvolněnému množství barviva ve vnějším roztoku po 72 h  $M_{out}$  bylo možné přičíst i uvolněné barvivo ve vnitřním roztoku  $M_{in} [g]$ .

Vztah pro výslednou frakci poté je:

$$f = \frac{M_{out} + c_{out}V_{in}}{M_0} \quad (10)$$

kde  $c_{out}$  [ $\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ] je koncentrace barviva ve vnějším roztoku po 72 hod a  $V_{in}$  [ml] je objem roztoku uvnitř membrány (10 ml). Výsledná maximální hodnota uvolněné frakce barviva po přepočtu byla stanovena průměrem ze tří měření a je uvedena v Tab. 7 včetně směrodatné odchylky.

Tab. 7: Maximální uvolněná frakce barviva po 72 h včetně směrodatné odchylky.

Vrstva	$\bar{f}$ [%]	$s_f$ [%]
V_L-HA	89,63	2,27
V_L-HA/HA	88,60	0,14
V_L-HA/F-HA	93,36	6,10
V_F-HA_2	97,98	0,18

Z výsledného grafu závislosti uvolňování na čase (Obr. 19) vyplývá, že kinetika uvolňování chlorofenolové červeně byla pro všechny nanovláknenné vrstvy téměř shodná. Zvolená nanovláknenná matrice tedy neměla na kinetiku uvolňování v tomto případě velký vliv. Na uvolňování měla vliv rozpustnost barviva ve vodném roztoku PBS, která byla pro chlorofenolovou červen vysoká. Závislost uvolněné frakce na čase dobře aproximovala Weibullova funkce (vzorec 9). Ve všech případech došlo k „burst“ efektu (velmi rychlé počáteční uvolňování), což pravděpodobně souviselo s dobrou rozpustností CR ve vodném prostředí (byl použit dostatečně velký objem roztoku). Většina barviva se uvolnila již po 8 hodinách a poté docházelo jen k minimálnímu nárůstu. Nejrychlejší uvolňování vykazovala vrstva V\_F-HA\_2, jejíž uvolněná frakce byla v jednotlivých časech nejvyšší.

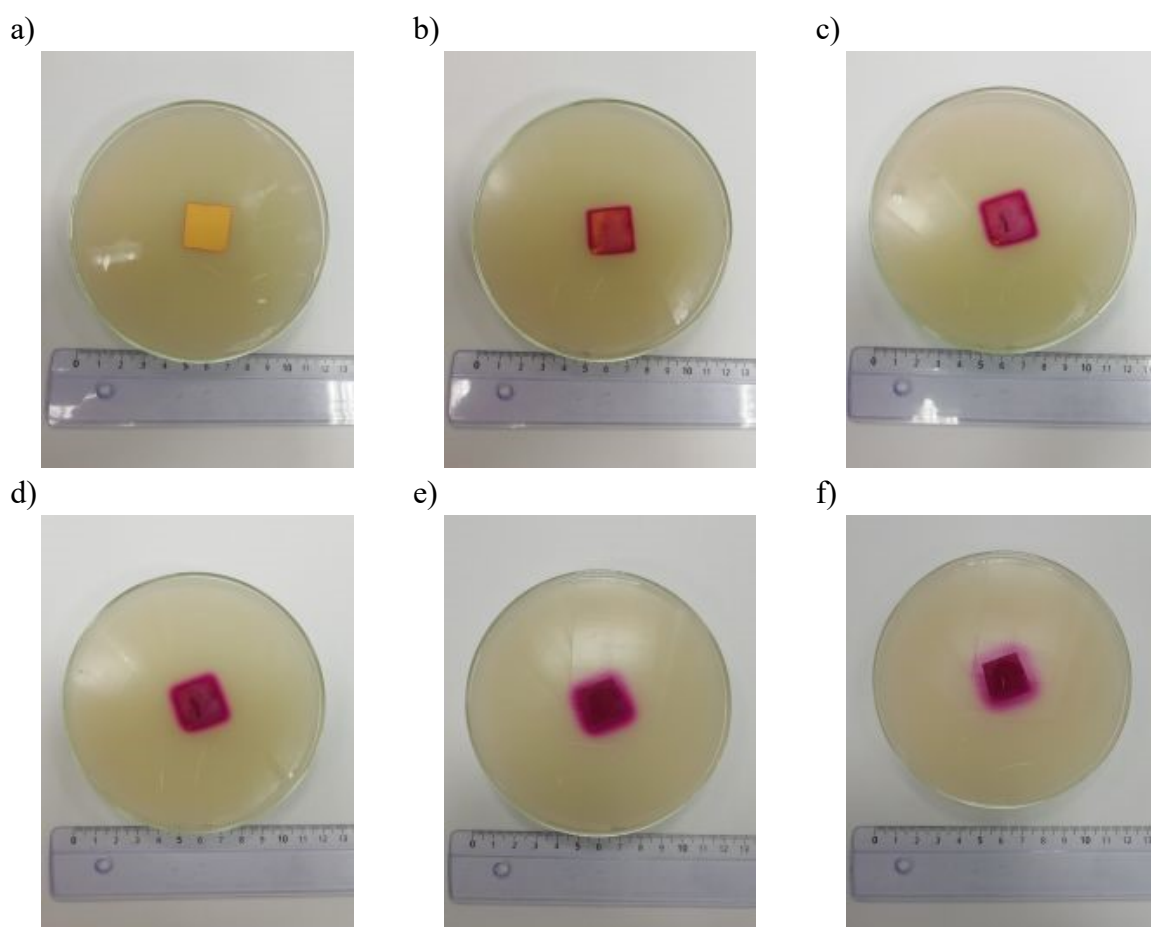
Jednotlivé vrstvy se lišily hodnotou maximální uvolněné frakce. Nejvyšší množství barviva se uvolnilo po 72 h z vrstvy V\_F-HA\_2, naopak nejnižší množství z vrstvy V\_L-HA/HA. Mezi těmito hodnotami se nacházela uvolněná frakce z vrstvy V\_L-HA/F-HA, která byla pravděpodobně ovlivněna přítomností obou derivátů kyseliny hyaluronové. Vyšší hodnota uvolněného barviva z vrstvy V\_F-HA byla pravděpodobně způsobena zachovanou nanovláknennou strukturou, díky níž barvivo lépe difundovalo do okolního roztoku. Oproti tomu u vrstev V\_L-HA a V\_L-HA/HA došlo k vytvoření filmu v roztoku PBS (Kap. 6.5.), což ztěžovalo průběh difuze barviva do okolního roztoku.

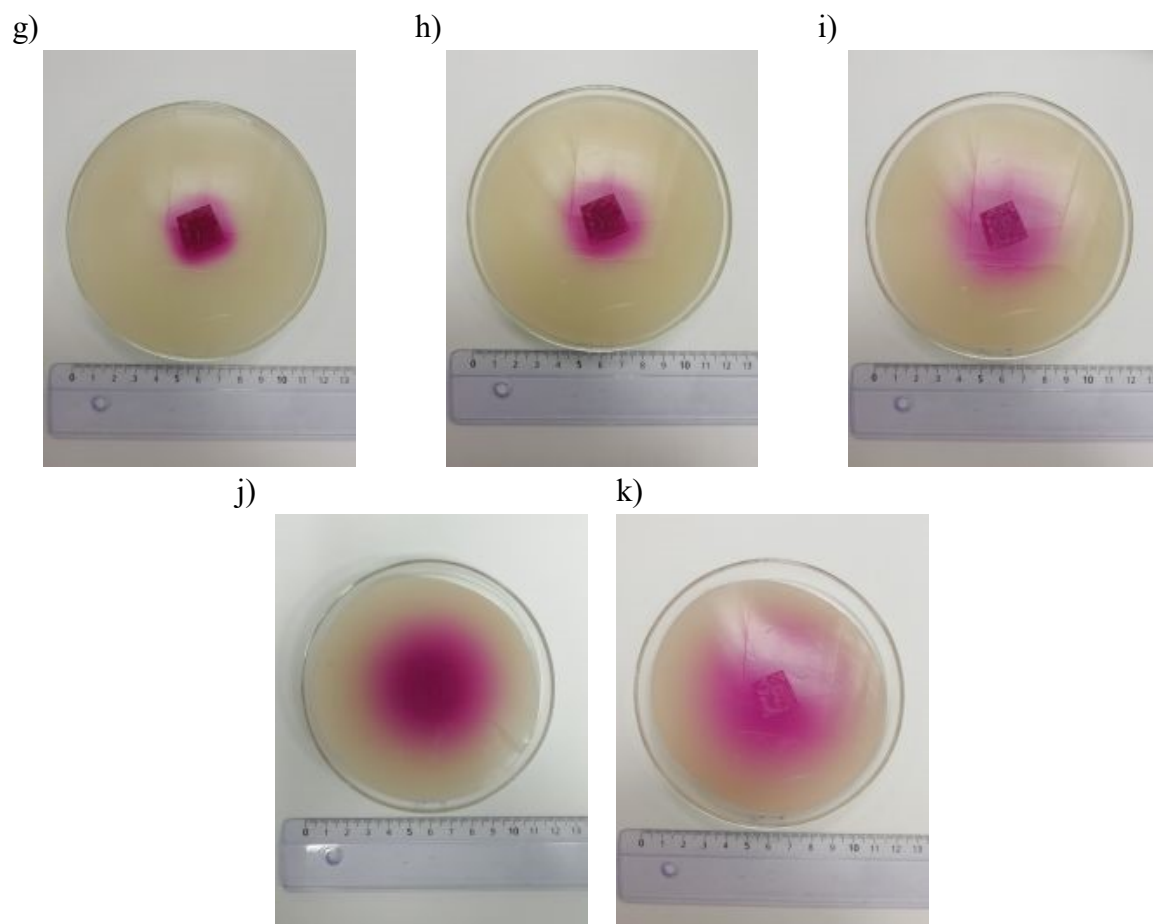
Žádná kombinace zvolených polymerů a barviva nevedla k postupnému uvolňování. „Burst“ efekt bývá v mnoha farmakologických aplikacích považován za nežádoucí. Okamžité

uvolnění léčiva může být nebezpečné zejména z důvodu toxicity léčiva při vysokých koncentracích v těle. Nevýhodou může být i snížení účinnosti podávaného léčiva, které není při rychlém podání účinně využito. Snahou mnoha vědců je proto vyvíjet systémy s řízeným postupným uvolňováním léčiv. Avšak v některých aplikacích je „burst“ efekt žádoucí. V některých prostředcích pro hojení ran počáteční rychlé uvolnění léčiva okamžitě pomáhá od bolesti a následné déletrvající uvolňování přispívá k hojení ran. Rychlé uvolnění léčiva (při změně podmínek prostředí) je také žádoucí v aplikacích s pulzním (přerušovaným) uvolňováním léčiv [62].

### 6.7. Uvolňování barviva do gelu

Kvalitativně bylo zkoumáno uvolňování chlorofenolové červeně z nanovláknenných vrstev o velikosti  $(2 \times 2) \text{ cm}^2$  do agarů při  $37^\circ \text{C}$ , které může simulovat uvolňování v reálném případě (v aplikacích na hojení ran). Kinetika uvolňování barviva se lišila od uvolňování pomocí vsádkové metody. V průběhu času docházelo k postupné difuzi barviva gelem. Pro větší přehlednost je průběh uvolňování barviva na Obr. 20 znázorněn jen pro vrstvu V\_L-HA/HA. Pro ostatní vrstvy je uveden v příloze 5.



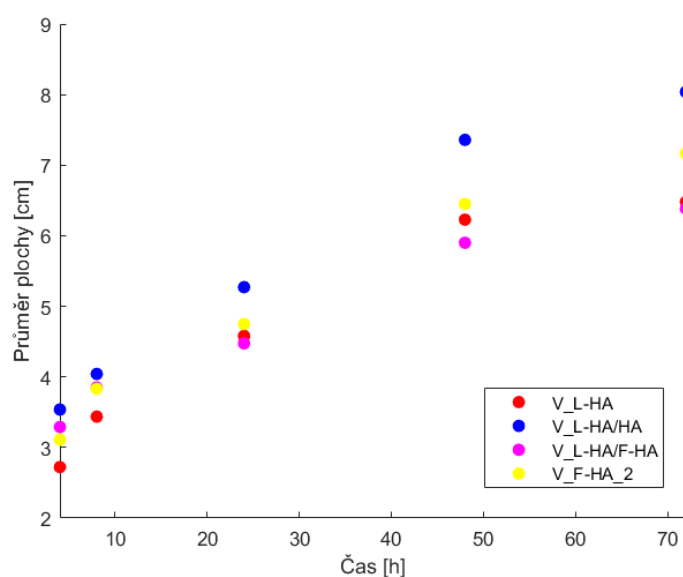


Obr. 20: Uvolňování barviva do gelu z vrstvy V\_L-HA/HA a) 0 h, b) 15 min, c) 30 min, d) 1 h, e) 2 h, f) 3 h, g) 4 h, h) 8 h, i) 24 h, j) 48 h, k) 72 h.

Pomocí softwaru ImageJ 1.48 byly porovnány velikosti ploch rozšíření barviva pro jednotlivé vrstvy z jednotlivých snímků. Průměr ploch byl stanoven z 5 měření z 1 snímku. Tab. 8 a Obr. 21 shrnují závislost velikosti průměru kruhové plochy na čase (měření bylo provedeno pro snímky 4 h, 8 h, 24 h, 48 h a 72 h). Měření bylo pro každou vrstvu provedeno jednou (1 snímek), proto nebyly vypočteny směrodatné odchylky. Závislost nárůstu velikosti plochy na čase byla pro všechny vrstvy podobná. Nejvíce se barvivo rozšířilo z vrstvy V\_L-HA/HA. Difuzi barviva z jednotlivých vrstev mohla ovlivnit hustota gelu, který nebyl úplně homogenní. K experimentu byly použity stejně velké části vrstvy, které však obsahovaly odlišné počáteční množství barviva (v závislosti na hmotnosti vrstvy a enkapsulační účinnosti), a proto nebylo možné výsledky porovnat se vsádkovou metodou.

Tab. 8: Průměr plochy rozšíření barviva v gelu v závislosti na čase.

Vrstva	Průměr plochy [cm]				
	4 h	8 h	24 h	48 h	72 h
V_L-HA	2,7	3,4	4,6	6,2	6,5
V_L-HA/HA	3,5	4,0	5,3	7,4	8,0
V_L-HA/F-HA	3,3	3,8	4,5	5,9	6,4
V_F-HA_2	3,1	3,8	4,7	6,5	7,2



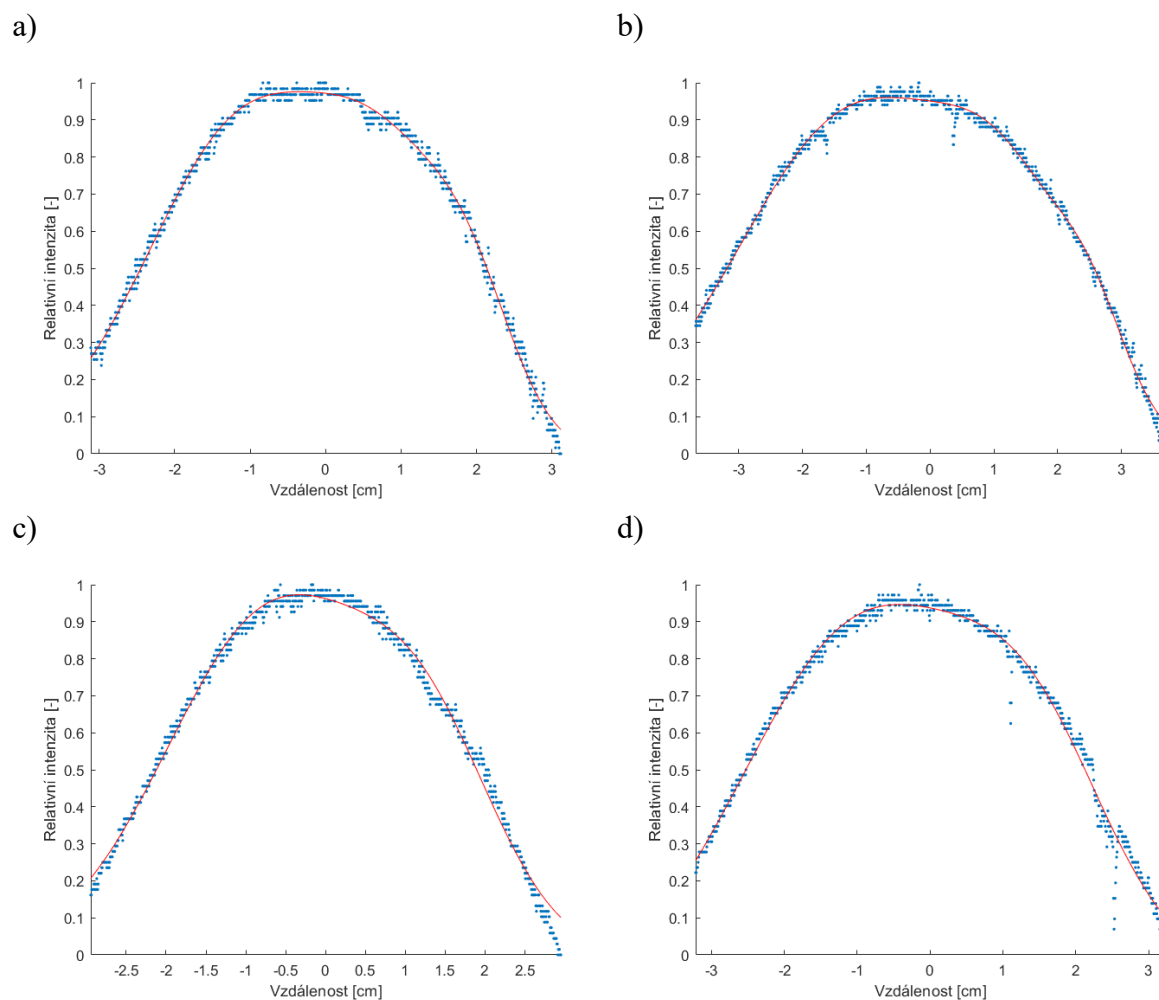
Obr. 21: Průměr plochy rozšíření barviva v gelu v závislosti na čase.

Koncentrace barviva nebyla v celé kruhové ploše stejná, docházelo k postupné difuzi barviva od dané vrstvy. Pro zjištění přibližného rozložení relativní koncentrace barviva v dané ploše byl snímek oříznut (obsahoval pouze danou plochu s barvivem) a převeden do stupňů šedi. Byla zvolena horizontální přímka procházející středem dané plochy, v rámci které byly zjištěny kódy barev jednotlivých pixelů v odstínech šedi, které odpovídají intenzitě. Intenzita barvy by následně měla odpovídat koncentraci barviva v daném místě v případě rovnoměrného osvětlení snímku. Hodnoty intenzity byly normovány pro získání relativní intenzity. Hodnoty relativní intenzity byly vyneseny v závislosti na vzdálenosti od středu plochy barviva v obou směrech podél zvolené horizontální přímky, závislost je uvedena na Obr. 22. Výpočet byl proveden pro snímky barviva v gelu po 48 hodinách pro všechny vrstvy.

Všechny získané výsledky bylo možné proložit křivkou odpovídající Gaussovu smíšenému modelu, který vzniká lineární kombinací Gaussových funkcí [63] (konkrétně byla použita lineární kombinace tří Gaussových funkcí). Rozložení koncentrace barviva podél horizontální



přímky tedy odpovídalo Gaussovu rozložení (pro jednorozměrný případ), což souviselo se schopností barviva difundovat gelem. Dle zbarvení snímků (barvivo se rozšiřovalo od středu) lze předpokládat, že podél jakékoli zvolené přímky bylo barvivo rozloženo dle Gaussovy křivky.



Obr. 22: Závislost relativní intenzity na poloze od středu plochy s barvivem po 48 h a) V\_L-HA, b) V\_L-HA/HA, c) V\_L-HA/F-HA, d) V\_F-HA\_2.

## 7. Závěr

V rámci bakalářské práce byly úspěšně připraveny nanovláknenné vrstvy na bázi derivátů kyseliny hyaluronové metodou elektrostatického zvlákňování. Nanovláknenné vrstvy byly složeny z různých kombinací polymerů (kyselina hyaluronová, lauroyl hyaluronan, furanyl hyaluronan), ke kterým byl navíc přidán vláknotvorný polymer polyethylenoxid. Metodou vláknění z pravého roztoku bylo do všech nanovláknenných vrstev inkorporováno modelové barvivo chlorofenolová červeň. Pro všechny roztoky byly nalezeny optimální parametry procesu elektrostatického zvlákňování, aby proces probíhal co nejúčinněji. Pro zvlákňování roztoku obsahujícího furanyl hyaluronan bylo nutné použít vyšší hmotnostní podíl polyethylenoxidu. V průběhu vláknění všech roztoků bylo nutné udržovat nízkou relativní vlhkost vzduchu v komoře přístroje 4SPIN LAB.

Morfologie připravených nanovláknenných vrstev byla studována pomocí skenovací elektronové mikroskopie. Vláknena všech vrstev byla orientována náhodně. Vláknena vrstev V\_L-HA, V\_L-HA/HA a V\_F-HA\_2 byla vesměs hladká, bez přítomnosti výrazných defektů. Ve vrstvě V\_L-HA/F-HA se nacházela také vlákna s drsnější texturou. Po zesílení UV zářením u vrstev obsahujících F-HA nedošlo k výrazné změně morfologie vláken. Distribuce průměrů vláken byla charakterizována lognormálním rozdělením. Vrstva V\_F-HA\_2 měla oproti zbývajícím vrstvám nejmenší průměr vláken a nejužší distribuci průměrů vláken. Byla také stanovena gramáž jednotlivých vrstev, jejíž hodnoty ovšem nebylo možné porovnat z hlediska produktivity procesu ES z důvodu odlišného času vláknění jednotlivých vrstev. U všech vrstev bylo dosaženo dostatečné gramáže, připravené vrstvy byly tedy samonosné a bylo možné s nimi snadno manipulovat. Enkapsulační účinnost barviva byla stanovena pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie a UV-VIS spektrofotometrie. Nejvyšší enkapsulační účinnosti bylo dosaženo u vrstvy V\_L-HA (proces vláknění byl z tohoto hlediska nejefektivnější) a naopak nejnižší u vrstvy V\_F-HA\_2.

Botnavost nanovláknenných vrstev byla zkoumána v roztoku fosfátového pufru v čase 0,5–72 hodin. K výraznému nárůstu hmotnosti vrstev došlo již po 30 minutách, poté se již hmotnost příliš neměnila. Nejvyšší botnavost měla vrstva V\_L-HA/F-HA. Vrstvy obsahující F-HA (V\_L-HA/F-HA a V\_F-HA\_2) si dle SEM snímků zachovaly nanovláknennou strukturu i po 72 hodinách. Tyto vrstvy v roztoku PBS zgelovatěly (ztratily své původní mechanické vlastnosti), a proto docházelo k jejich trhání. Naopak vrstvy V\_L-HA a V\_L-HA/HA si nanovláknennou strukturu nezachovaly, došlo k vytvoření filmu. V roztoku fosfátového pufru si

zachovaly své mechanické vlastnosti, zůstaly po celou dobu pevné a nedocházelo k jejich trhání, což je poměrně důležitým předpokladem pro využití vrstev zejména v oblasti biomedicínských aplikací. V rámci měření závislosti botnavosti na tloušťce vrstvy nebyla nalezena žádná závislost.

Uvolňování barviva bylo zkoumáno *in vitro* vsádkovou metodou s dialyzační membránou do roztoku fosfátového pufru s kumulativními odběry. Na kinetiku uvolňování měla vliv rozpustnost barviva ve vodném roztoku PBS, která byla pro chlorofenolovou červeň vysoká. Bylo prokázáno, že zvolené nanovláknenné matrice neměly na kinetiku uvolňování zásadní vliv. Závislost uvolněné frakce na čase ve všech případech dobře aproximovala Weibullova funkce. Během uvolňování došlo k „burst“ efektu pravděpodobně kvůli dobré rozpustnosti barviva ve velkém objemu fosfátového pufru (vodného média). „Burst“ efekt může být pro některé aplikace žádoucí např. v prostředcích na hojení ran. Většina barviva se uvolnila po 8 hodinách, poté byl nárůst jen minimální. Nejrychleji se barvivo uvolňovalo z vrstvy V\_F-HA\_2 a zároveň také celkové množství barviva uvolněné z této vrstvy po 72 hodinách bylo nejvyšší. To bylo pravděpodobně způsobeno zachovanou nanovláknennou strukturou, díky níž barvivo lépe difundovalo do okolního roztoku. Naopak nejmenší množství barviva se uvolnilo z vrstev V\_L-HA a V\_L-HA/HA pravděpodobně z důvodu vytvoření filmu, který ztěžoval difuzi barviva do okolního roztoku. Bylo sledováno také uvolňování barviva z nanovláknenných vrstev do gelu. Kinetika uvolňování se díky odlišnému prostředí lišila. V průběhu docházelo k postupné difuzi barviva gelem. Výsledné hodnoty rozšíření barviva nebylo možné porovnat s vsádkovou metodou z důvodu podmínek experimentu (odlišná počáteční hmotnost barviva, nehomogenní hustota gelu). Barvivo bylo v gelu rozloženo dle Gaussovy křivky.

## Seznam použité literatury

- [1] SUBBIAH, Thandavamoorthy, G. BHAT, R. TOCK, S. PARAMESWARAN a S. RAMKUMAR. Electrospinning of nanofibers. *Journal of Applied Polymer Science* [online]. 2005, **96**(2), 557-569 [cit. 2020-09-25]. ISSN 0021-8995. DOI: 10.1002/app.21481.
- [2] BHARDWAJ, Nandana a Subhas KUNDU. Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology Advances* [online]. 2010, **28**(3), 325-347 [cit. 2020-09-25]. ISSN 07349750. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2010.01.004.
- [3] DING, Bin, Xianfeng WANG a Jianyong YU. *Electrospinning: Nanofabrication and Applications*. Nizozemí: Elsevier, 2019. ISBN 978-0-323-51270-1.
- [4] WANG, Xushan a Koji NAKANE. Preparation of polymeric nanofibers via immersion electrospinning. *European Polymer Journal* [online]. 2020, **134** [cit. 2020-09-26]. ISSN 00143057. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2020.109837.
- [5] POKORNÝ, Marek, Vladimír RASSUSHIN, Lucie WOLFOVÁ a Vladimír VELEBNÝ. Increased production of nanofibrous materials by electroblowing from blends of hyaluronic acid and polyethylene oxide. *Polymer engineering and science* [online]. 2016, **56**(8), 932-938 [cit. 2020-11-04]. ISSN 00323888. DOI: 10.1002/pen.24322.
- [6] KRISHNAMOORTHY, T., V. THAVASI, V. AKSHARA, A. KUMAR, D. PLISZKA, S. MHAISALKAR a S. RAMAKRISHNA. Direct Deposition of Micron-Thick Aligned Ceramic TiO<sub>2</sub> Nanofibrous Film on FTOs by Double-Needle Electrospinning Using Air-Turbulence Shielded Disc Collector. *Journal of Nanomaterials* [online]. 2011, **2011**, 1-7 [cit. 2020-11-04]. ISSN 1687-4110. DOI: 10.1155/2011/739241.
- [7] NIU, Haitao a Tong LIN. Fiber Generators in Needleless Electrospinning. *Journal of Nanomaterials* [online]. 2012, **2012**, 1-13 [cit. 2020-10-03]. ISSN 1687-4110. DOI: 10.1155/2012/725950.
- [8] KOTZIANOVÁ, Adéla, Jan KLEMEŠ, Ondřej ŽÍDEK, Zdeněk MLYNÁŘ, Marek POKORNÝ a Vladimír VELEBNÝ. Effect of different emitter types on the production of

- nanofibrous tubular structures: Thickness uniformity and productivity. *AIP Advances* [online]. 2019, **9**(2) [cit. 2020-11-10]. ISSN 2158-3226. DOI: 10.1063/1.5088078.
- [9] ANDRADY, Anthony L. *Science and Technology of Polymer Nanofibers*. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2008. ISBN 978-0-471-79059-4.
- [10] ISLAM, Md, Bee ANG, Andri ANDRIYANA a Amalina AFIFI. A review on fabrication of nanofibers via electrospinning and their applications. *SN Applied Sciences* [online]. 2019, **1**(10) [cit. 2020-11-06]. ISSN 2523-3963. DOI: 10.1007/s42452-019-1288-4.
- [11] NEZARATI, Roya, Michelle EIFERT a Elizabeth COSGRIFF-HERNANDEZ. Effects of Humidity and Solution Viscosity on Electrospun Fiber Morphology. *Tissue Engineering Part C: Methods* [online]. 2013, **19**(10), 810-819 [cit. 2020-11-10]. ISSN 1937-3384. DOI: 10.1089/ten.tec.2012.0671.
- [12] FONG, H, I CHUN a D.H RENEKER. Beaded nanofibers formed during electrospinning. *Polymer* [online]. 1999, **40**(16), 4585-4592 [cit. 2020-09-30]. ISSN 00323861. DOI: 10.1016/S0032-3861(99)00068-3.
- [13] ZONG, Xinhua, Kwangsok KIM, Dufei FANG, Shaofeng RAN, Benjamin HSIAO a Benjamin CHU. Structure and process relationship of electrospun bioabsorbable nanofiber membranes. *Polymer* [online]. 2002, **43**(16), 4403-4412 [cit. 2020-09-30]. ISSN 00323861. DOI: 10.1016/S0032-3861(02)00275-6.
- [14] HUANG, Liwei, Nhu-Ngoc BUI, Seetha MANICKAM a Jeffrey MCCUTCHEON. Controlling electrospun nanofiber morphology and mechanical properties using humidity. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics* [online]. 2011, **49**(24), 1734-1744 [cit. 2020-09-30]. ISSN 08876266. DOI: 10.1002/polb.22371.
- [15] DE VRIEZE, S., T. VAN CAMP, A. NELVIG, B. HAGSTRÖM, P. WESTBROEK a K. DE CLERCK. The effect of temperature and humidity on electrospinning. *Journal of Materials Science* [online]. 2009, **44**(5), 1357-1362 [cit. 2020-09-30]. ISSN 0022-2461. DOI: 10.1007/s10853-008-3010-6.
- [16] BURDICK, Jason a Glenn PRESTWICH. Hyaluronic Acid Hydrogels for Biomedical Applications. *Advanced Materials* [online]. 2011, **23**(12), 41-56 [cit. 2020-10-06]. ISSN 09359648. DOI: 10.1002/adma.201003963.

- [17] PRAJAPATI, Vipul a Pankaj MAHERIYA. Hyaluronic acid as potential carrier in biomedical and drug delivery applications. *Functional Polysaccharides for Biomedical Applications* [online]. Elsevier, 2019, , 213-265 [cit. 2020-10-06]. ISBN 9780081025550. DOI: 10.1016/B978-0-08-102555-0.00007-8.
- [18] NEČAS, J., L. BARTOŠÍKOVÁ, P. BRAUNER a J. KOLAR. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Veterinární Medicína* [online]. 2008, **53**(8), 397-411 [cit. 2020-10-08]. ISSN 03758427. DOI: 10.17221/1930-VETMED.
- [19] FALLACARA, Arianna, Erika BALDINI, Stefano MANFREDINI a Silvia VERTUANI. Hyaluronic Acid in the Third Millennium. *Polymers* [online]. 2018, **10**(7), 701 [cit. 2020-10-08]. ISSN 2073-4360. DOI: 10.3390/polym10070701.
- [20] VASVANI, Shyam, Pratik KULKARNI a Deepak RAWTANI. Hyaluronic acid: A review on its biology, aspects of drug delivery, route of administrations and a special emphasis on its approved marketed products and recent clinical studies. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2020, **151**, 1012-1029 [cit. 2020-10-08]. ISSN 01418130. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.11.066.
- [21] Léčivé látky. *CONTIPRO* [online]. Dolní Dobruč, 2017 [cit. 2020-10-08]. Dostupné z: <https://www.contipro.cz/portfolio/farmaceuticka-kyselina-hyaluronova>.
- [22] HUERTA-ANGELES, Gloria, Martina BRANDEJSOVÁ, Kateřina KNOTKOVÁ, Martina HERMANNOVÁ, Martina MORAVCOVÁ, Daniela ŠMEJKALOVÁ a Vladimír VELEBNÝ. Synthesis of photo-crosslinkable hyaluronan with tailored degree of substitution suitable for production of water resistant nanofibers. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2016, **137**, 255-263 [cit. 2020-10-13]. ISSN 01448617. DOI: 10.1016/j.carbpol.2015.10.077.
- [23] CHMELAR, Josef, Jiří MRÁZEK, Martina HERMANNOVÁ et al. Biodegradable free-standing films from lauroyl derivatives of hyaluronan. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2019, **224**, 115-162 [cit. 2020-10-14]. ISSN 01448617. DOI: 10.1016/j.carbpol.2019.115162.
- [24] LIU, Yang, Guiping MA, Dawei FANG, Juan XU, Hongwen ZHANG a Jun NIE. Effects of solution properties and electric field on the electrospinning of hyaluronic acid.

- Carbohydrate Polymers* [online]. 2011, **83**(2), 1011-1015 [cit. 2020-10-09]. ISSN 01448617. DOI: 10.1016/j.carbpol.2010.08.061.
- [25] AHIRE, J.J., D.D. ROBERTSON, A.J. VAN REENEN a L.M.T. DICKS. Polyethylene oxide (PEO)-hyaluronic acid (HA) nanofibers with kanamycin inhibits the growth of *Listeria monocytogenes*. *Biomedicine & Pharmacotherapy* [online]. 2017, **86**, 143-148 [cit. 2020-10-09]. ISSN 07533322. DOI: 10.1016/j.biopha.2016.12.006.
- [26] JI, Yuan, Kaustabh GHOSH, Bingquan LI, Jonathan SOKOLOV, Richard CLARK a Miriam RAFILOVICH. Dual-Syringe Reactive Electrospinning of Cross-Linked Hyaluronic Acid Hydrogel Nanofibers for Tissue Engineering Applications. *Macromolecular Bioscience* [online]. 2006, **6**(10), 811-817 [cit. 2021-02-10]. ISSN 16165187. DOI: 10.1002/mabi.200600132.
- [27] HUANG, Gangliang a Junrong CHEN. Preparation and applications of hyaluronic acid and its derivatives. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2019, **125**, 478-484 [cit. 2021-02-11]. ISSN 01418130. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.12.074.
- [28] KIM, Hyemin, Hyeonseon JEONG, Seulgi HAN, Songeun BEACK, Byung HWANG, Myeonghwan SHIN, Seung OH a Sei HAHN. Hyaluronate and its derivatives for customized biomedical applications. *Biomaterials* [online]. 2017, **123**, 155-171 [cit. 2021-02-10]. ISSN 01429612. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2017.01.029.
- [29] PRESTWICH, Glenn, Dale MARECAK, James MARECEK, Koen VERCRUYSSSE a Michael ZIEBELL. Controlled chemical modification of hyaluronic acid: synthesis, applications, and biodegradation of hydrazide derivatives. *Journal of Controlled Release* [online]. 1998, **53**(1-3), 93-103 [cit. 2021-02-11]. ISSN 01683659. DOI: 10.1016/S0168-3659(97)00242-3.
- [30] COLLINS, Maurice a Colin BIRKINSHAW. Hyaluronic acid based scaffolds for tissue engineering—A review. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2013, **92**(2), 1262-1279 [cit. 2021-02-10]. ISSN 01448617. DOI: 10.1016/j.carbpol.2012.10.028.
- [31] CHANDA, Amit, Jaideep ADHIKARI, Aritri GHOSH, Sougata CHOWDHURY, Sabu THOMAS, Pallab DATTA a Prosenjit SAHA. Electrospun chitosan/polycaprolactone-hyaluronic acid bilayered scaffold for potential wound healing applications. *International*

- Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2018, **116**, 774-785 [cit. 2021-02-10]. ISSN 01418130. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.05.099.
- [32] LAFFLEUR, Flavia a Sabrina DACHS. Development of novel mucoadhesive hyaluronic acid derivate as lubricant for the treatment of dry eye syndrome. *Therapeutic Delivery* [online]. 2015, **6**(10), 1211-1219 [cit. 2021-02-10]. ISSN 2041-5990. DOI: 10.4155/tde.15.55.
- [33] BALUSAMY, Brabu, Asli CELEBIOGLU, Anitha SENTHAMIZHAN a Tamer UYAR. Progress in the design and development of “fast-dissolving” electrospun nanofibers based drug delivery systems - A systematic review. *Journal of Controlled Release* [online]. 2020, **326**, 482-509 [cit. 2021-02-02]. ISSN 01683659. DOI: 10.1016/j.jconrel.2020.07.038.
- [34] PRIYADARSHINI, B.M., S.T. SELVAN, T.B. LU, H. XIE, J. NEO a A.S. FAWZY. Chlorhexidine Nanocapsule Drug Delivery Approach to the Resin-Dentin Interface. *Journal of Dental Research* [online]. 2016, **95**(9), 1065-1072 [cit. 2021-02-02]. ISSN 0022-0345. DOI: 10.1177/0022034516656135.
- [35] GARBAYO, Elisa, Simon PASCUAL-GIL, Carlos RODRÍGUEZ-NOGALES, Laura SALUDAS, Ander ESTELLA-HERMOSO DE MENDOZA a Maria BLANCO-PRIETO. Nanomedicine and drug delivery systems in cancer and regenerative medicine. *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology* [online]. 2020, **12**(5) [cit. 2021-02-02]. ISSN 1939-5116. DOI: 10.1002/wnan.1637.
- [36] GOONOO, Nowsheen, Archana BHAW-LUXIMON a Dhanjay JHURRY. Drug Loading and Release from Electrospun Biodegradable Nanofibers. *Journal of Biomedical Nanotechnology* [online]. 2014, **10**(9), 2173-2199 [cit. 2020-12-05]. ISSN 15507033. DOI: 10.1166/jbn.2014.1885.
- [37] JAIN, Kewal K. *Drug Delivery Systems*. 1. Totowa: Humana Press, 2008. ISBN 978-1-58829-891-1.
- [38] KHODADADI, Meysam, Sepideh ALIJANI, Maryam MONTAZERI, Niloufar ESMAEILIZADEH, Shima SADEGHI-SOUREH a Younes PILEHVAR-SOLTANAHMADI. Recent advances in electrospun nanofiber- mediated drug delivery



- strategies for localized cancer chemotherapy. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* [online]. 2020, **108**(7), 1444-1458 [cit. 2021-02-02]. ISSN 1549-3296. DOI: 10.1002/jbm.a.36912.
- [39] GÖTTEL, Benedikt, Juliana DE SOUZA E SILVA, Cristine SANTOS DE OLIVEIRA, Frank SYROWATKA, Miltiadis FIORENTZIS, Anja VIESTENZ, Arne VIESTENZ a Karsten MÄDER. Electrospun nanofibers – A promising solid in-situ gelling alternative for ocular drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* [online]. 2020, **146**, 125-132 [cit. 2021-02-02]. ISSN 09396411. DOI: 10.1016/j.ejpb.2019.11.012.
- [40] CELEBIOGLU, Asli a Tamer UYAR. Hydrocortisone/cyclodextrin complex electrospun nanofibers for a fast-dissolving oral drug delivery system. *RSC Medicinal Chemistry* [online]. 2020, **11**(2), 245-258 [cit. 2021-02-02]. ISSN 2632-8682. DOI: 10.1039/C9MD00390H.
- [41] BOATENG, Joshua, Kerr MATTHEWS, Howard STEVENS a Gillian ECCLESTON. Wound Healing Dressings and Drug Delivery Systems: A Review. *Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2008, **97**(8), 2892-2923 [cit. 2021-02-02]. ISSN 00223549. DOI: 10.1002/jps.21210.
- [42] BRUSCHI, Marcos Luciano. *Strategies to modify the drug release from pharmaceutical systems*. Cambridge: Woodhead Publishing, 2015. ISBN 978-0-08-100092-2.
- [43] CORNEJO BRAVO, José, Luis VILLARREAL GÓMEZ a Aracely SERRANO MEDINA. Electrospinning for Drug Delivery Systems: Drug Incorporation Techniques. *Electrospinning - Material, Techniques, and Biomedical Applications* [online]. InTech, 2016 [cit. 2020-12-05]. ISBN 978-953-51-2821-2. DOI: 10.5772/65939.
- [44] AZIMI, Bahareh, Homa MALEKI, Lorenzo ZAVAGNA, Jose DE LA OSSA, Stefano LINARI, Andrea LAZZERI a Serena DANTI. Bio-Based Electrospun Fibers for Wound Healing. *Journal of Functional Biomaterials* [online]. 2020, **11**(3), 67 [cit. 2020-12-04]. ISSN 2079-4983. DOI: 10.3390/jfb11030067.
- [45] ZHANG, Qiang, Yingchun LI, Zhi LIN, Kenneth WONG, Min LIN, Lara YILDIRIMER a Xin ZHAO. Electrospun polymeric micro/nanofibrous scaffolds for long-term drug

- release and their biomedical applications. *Drug Discovery Today* [online]. 2017, **22**(9), 1351-1366 [cit. 2020-12-13]. ISSN 13596446. DOI: 10.1016/j.drudis.2017.05.007.
- [46] CHENG, Huiling, Xiaoye YANG, Xin CHE, Mingshi YANG a Guangxi ZHAI. Biomedical application and controlled drug release of electrospun fibrous materials. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 2018, **90**, 750-763 [cit. 2020-12-13]. ISSN 09284931. DOI: 10.1016/j.msec.2018.05.007.
- [47] SA'ADON, Shafizah, Saiful ABD RAZAK, Al EMRAN ISMAIL a Khalida FAKHRUDDIN. Drug-Loaded Poly-Vinyl Alcohol Electrospun Nanofibers for Transdermal Drug Delivery: Review on Factors Affecting the Drug Release. *Procedia Computer Science* [online]. 2019, **158**, 436-442 [cit. 2020-07-09]. DOI: 10.1016/j.procs.2019.09.073.
- [48] MADERUELO, Cristina, Aránzazu ZARZUELO a José LANAÑO. Critical factors in the release of drugs from sustained release hydrophilic matrices. *Journal of Controlled Release* [online]. 2011, **154**(1), 2-19 [cit. 2020-12-27]. ISSN 01683659. DOI: 10.1016/j.jconrel.2011.04.002.
- [49] PADMAKUMAR MTECH, Smrithi. Long-term drug delivery using implantable electrospun woven polymeric nanotextiles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* [online]. 2019, **15**(1), 274-284 [cit. 2020-07-09]. DOI: 10.1016/j.nano.2018.10.002.
- [50] ZENG, Jing, Lixin YANG, Qizhi LIANG, Xuefei ZHANG, Huili GUAN, Xiuling XU, Xuesi CHEN a Xiabin JING. Influence of the drug compatibility with polymer solution on the release kinetics of electrospun fiber formulation. *Journal of Controlled Release* [online]. 2005, **105**(1-2), 43-51 [cit. 2020-12-27]. ISSN 01683659. DOI: 10.1016/j.jconrel.2005.02.024.
- [51] JALVANDI, Javid, Max WHITE, Yuan GAO, Yen TRUONG, Rajiv PADHYE a Ilias KYRATZIS. Polyvinyl alcohol composite nanofibres containing conjugated levofloxacin-chitosan for controlled drug release. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 2017, **73**, 440-446 [cit. 2020-12-28]. ISSN 09284931. DOI: 10.1016/j.msec.2016.12.112.

- [52] WEI, Zhimei, Wei ZHAO, Yimin WANG, Xiaojun WANG, Shengru LONG a Jie YANG. Novel PNIPAm-based electrospun nanofibres used directly as a drug carrier for “on-off” switchable drug release. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. 2019, **182**, 110347 [cit. 2020-12-28]. ISSN 09277765. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2019.110347.
- [53] D’SOUZA, Susan. A Review of In Vitro Drug Release Test Methods for Nano-Sized Dosage Forms. *Advances in Pharmaceutics* [online]. 2014, **2014**, 1-12 [cit. 2021-02-09]. ISSN 2356-6841. DOI: 10.1155/2014/304757.
- [54] JUG, Mario, Anita HAFNER, Jasmina LOVRIĆ, Maja KREGAR, Ivan PEPIĆ, Željka VANIĆ, Biserka CETINA-ČIŽMEK a Jelena FILIPOVIĆ-GRČIĆ. An overview of in vitro dissolution/release methods for novel mucosal drug delivery systems. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2018, **147**, 350-366 [cit. 2021-02-09]. ISSN 07317085. DOI: 10.1016/j.jpba.2017.06.072.
- [55] YU, Minzhi, Wenmin YUAN, Dan LI, Anna SCHWENDEMAN a Steven SCHWENDEMAN. Predicting drug release kinetics from nanocarriers inside dialysis bags. *Journal of Controlled Release* [online]. 2019, **315**, 23-30 [cit. 2020-10-13]. ISSN 01683659. DOI: 10.1016/j.jconrel.2019.09.016.
- [56] Linear Multi Needleless E5. *4SPIN* [online]. Dolní Dobrouč: Contipro a.s., 2015 [cit. 2021-04-10]. Dostupné z: <https://www.4spin.info/portfolio/emitters/e5-linear-multi-needleless>.
- [57] Rotating continual collector C3. *4SPIN* [online]. Dolní Dobrouč: Contipro a.s., 2015 [cit. 2021-04-10]. Dostupné z: <https://www.4spin.info/portfolio/collectors/c3-rotating-continual>.
- [58] PETRÍK, Stanislav. Industrial Production Technology for Nanofibers. *Nanofibers - Production, Properties and Functional Applications* [online]. InTech, 2011 [cit. 2021-03-20]. ISBN 978-953-307-420-7. DOI: 10.5772/24703.
- [59] ACHBERGEROVÁ, Eva. *Vývoj vhodné modifikace hydrofobizované kyseliny hyaluronové pro přípravu teranostik* [online]. Zlín, 2018 [cit. 2021-03-02]. Dostupné z: <https://digilib.k.utb.cz/handle/10563/43753>. Disertační práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Vedoucí práce Robert Vícha.

- [60] FENNESSEY, Sian a Richard FARRIS. Fabrication of aligned and molecularly oriented electrospun polyacrylonitrile nanofibers and the mechanical behavior of their twisted yarns. *Polymer* [online]. 2004, **45**(12), 4217-4225 [cit. 2021-04-09]. ISSN 00323861. DOI: 10.1016/j.polymer.2004.04.001.
- [61] PAVLÍK, Jiří. *Aplikovaná statistika*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2005. ISBN 80-708-0569-2.
- [62] HUANG, Xiao a Christopher BRAZEL. On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems. *Journal of Controlled Release* [online]. 2001, **73**(2-3), 121-136 [cit. 2021-03-22]. ISSN 01683659. DOI: 10.1016/S0168-3659(01)00248-6.
- [63] ČERMÁK, Jan. *Rozpoznávání emočních stavů na základě analýzy řečového signálu* [online]. Brno, 2009 [cit. 2021-03-25]. Dostupné z: [https://www.vutbr.cz/www\\_base/zav\\_prace\\_soubor\\_verejne.php?file\\_id=14415](https://www.vutbr.cz/www_base/zav_prace_soubor_verejne.php?file_id=14415). Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně.